

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica
para a detecção simultânea de resíduos de
coccidiostáticos em amostras de fígado por LC-MS/MS**

Dissertação

Ana Lúcia Filipe Rodrigues

Mestrado em Química

Especialização em Química, Saúde e Nutrição

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica
para a detecção simultânea de resíduos de
coccidiostáticos em amostras de fígado por LC-MS/MS**

Dissertação orientada por:

Doutor Jorge Manuel da Silva Barbosa

Professora Doutora Susana Pina dos Santos

Mestrado em Química

Especialização em Química, Saúde e Nutrição

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Jorge Barbosa, pela orientação, apoio e disponibilidade que sempre dispôs na realização desta tese.

À Professora Doutora Susana Santos não só pela ajuda e orientação na execução do mestrado, mas também pela amizade e presença na minha vida pessoal e profissional ao longo dos anos. Obrigada!

Queria agradecer à Andreia Freitas que tornou possível a execução da parte experimental do mestrado. Agradeço a todos os colegas do laboratório pela simpatia em especial a D. Fernanda Tavares.

À Professora Doutora Laurentina Pedroso, da Faculdade de Medicina Veterinária da ULHT pelo incentivo e por me ter proporcionado a realização deste trabalho.

À Guidinha pela sua disponibilidade e ajuda.

Aos meus colegas e amigos que estiveram sempre presentes.

Aos meus sobrinhos pela alegria constante e conseguirem dar-me disponibilidade mental para a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmã que me apoiam incondicionalmente.

Ao meu marido por todo o encorajamento e pela demonstração contínua de carinho e apoio.

A todos aqueles que, não estando aqui mencionados, de alguma forma me apoiaram na realização deste mestrado, em especial a minha enorme família!

Abreviaturas

.
ABF – Amostra em branco fortificada
ABR – Amostra em branco
BVL- Laboratório comunitário de referência
CCDs- Coccidiostáticos
CCF- Cromatografia de camada fina
CC α – Limite de decisão
CC β – Capacidade de detecção
CE- Comunidade Europeia
CEE- Comunidade económica Europeia
CV – Coeficiente de variação
DCZ- Diclazuril
DNC- Dinitrocarbanilida
DNC_d8- Dinitrocarbanilida deuterada (padrão interno)
EC – Energia de colisão
ESI – Ionização por “electrospray” (Electrospray ionization)
ESI (-) – Ionização por “electrospray” em modo negativo (Electrospray ionization- negative mode)
ESI (+) – Ionização por “electrospray” em modo positivo (Electrospray ionization- positive mode)
FEEDAP- Painel dos aditivos e produtos ou substâncias utilizados na alimentação animal da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
Gc- Cromatografia gasosa (Gas chromatography)
HFG- Halofuginona
HPLC - Cromatografia líquida de elevada eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS- Cromatografia líquida de elevada eficiência acoplada à espectrometria de massa (High Performance Liquid Chromatography- Mass spectrometry)
INIAV- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

LC/ESI/MS- Cromatografia líquida acoplada a ionização por “electrospray” com detecção por espectrometria de massa (Liquid Chromatography- electrospray ionization mass spectrometry)

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (Liquid chromatography tandem mass spectrometry)

LMR – Limite máximo de resíduos

LSD- Lasalocida

MDM- Maduramicina

MDP- Mistura directa de padrões

MRM- Monitorização de reacções múltiplas

MS- Espectrometria de massa (Mass spectrometry)

MSN- Monensina

NIG- Nigericina (padrão interno)

NRS- Narasina

PI- Padrão interno

PNCR – Plano Nacional de Controlo de Resíduos.

PVDF- Fluoreto de polivinilideno

RBD- Robenidina

SIM- Monitorização de um ião

SLM- Salinomicina

TR – Tempo de retenção.

TRR– Tempo de retenção relativo

UE- União Europeia

UV/VIS- Luz ultravioleta/Luz visível

Resumo

Os medicamentos veterinários são amplamente utilizados em sistemas de produção intensiva de animais para consumo humano, na profilaxia e terapia de patologias e como promotores de crescimento. Estes compostos são adicionados na água de bebida, em implantes ou como suplementos na alimentação animal.

Os compostos avaliados no presente estudo foram os coccidiostáticos que são um grupo de compostos utilizados como aditivos alimentares ou como promotores de crescimento, para prevenção e tratamento de coccidiose, uma doença infecciosa causada por protozoários do género *Eimeria*. A coccidiose, , incide especialmente em frangos, perus e coelhos, sendo estes os principais sectores a utilizar medidas de controlo a fim de prevenir esta doença mortal. Contudo, pode também atingir bovinos e suínos. A utilização de coccidistáticos está permitida na União Europeia embora sujeita a restrições, estando estabelecidos limites máximos de resíduos (LMR), para cada composto nas diferentes espécies animais e para cada tecido ou produto edível.

Este estudo centrou-se no desenvolvimento e na validação de uma metodologia analítica, por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS), para a detecção e quantificação simultânea em fígado, de robenidina, halofuginona, diclazuril, nicarbazina, monensina, salinomina, narasina, lasalocida e maduramicina. O método desenvolvido neste trabalho, cuja validação se baseou nos critérios de validação da Decisão da Comissão 2002/657/CE demonstrou ser selectivo, específico e robusto.

Para os compostos estudados os valores de recuperação foram superiores a 90% e inferiores a 102%, para o critério máximo de 80 a 110%, exceptuando os compostos monesina e salinomina, cujo critério máximo a aplicar foi de 70 a 100%.

No estudo de reprodutibilidade os valores obtidos para o composto nicarbazina demonstraram ser os mais reprodutíveis com coeficiente de variação (CV), de 13.48%. Todos os resultados obtidos foram inferiores aos valores resultantes da equação de Horwitz para cada LMR.

Os valores de limite de decisão ($CC\alpha$), e capacidade de detecção ($CC\beta$), obtidos variaram entre 2.5 µg/kg e 4.5 µg/kg para a maduramicina e entre 108 µg/kg e 144 µg/kg para a nicarbazina.

De acordo com os resultados de validação obtidos para a metodologia desenvolvida conclui-se que este procedimento permite o controlo analítico de amostras de fígado de origem animal para a detecção da presença dos coccidiostáticos referidos nas concentrações de interesse, designadamente nos respectivos limites máximo de resíduo.

Palavras-chave

coccidiose, coccidiostáticos, robenidina, halofuginona, diclazuril, nicarbazina, monensina, salinomicina, narasina, lasalocida, maduramicina, LC-MS-MS, validação.

Abstract

Veterinary medicinal compounds are widely used in developed countries to treat and protect animals' health. Some of these compounds are used as growth promoters and added as supplements for animal feed.

Veterinary medicinal compounds are widely used in intensive animal farming for prophylaxis or treatment of diseases and as growth promoters. These compounds are usually added to the water or as supplement of their feed or by means of an implant.

The compounds evaluated in this project were the coccidiostats. They are a group of compounds used as food additives or growth promoter agents, for the prevention and treatment of coccidiosis, an infectious disease caused by the protozoa *Eimeria*. Coccidiosis occurs mainly in chickens, turkeys and rabbits, and therefore these sectors use strict quality control measures in order to prevent this deadly disease. Although in a lower incidence this disease can also occur in cattle and pigs.

The use of coccidiostats is permitted in the European Union but is subject to restrictions. There are Maximum Residue Limits (MRL) established for each compound, in each different animal species, and for each tissue or edible product.

The aim of this study was to develop and validate an analytical procedure for simultaneous detection and quantification of robenidine, halofuginone, diclazuril, nicarbazin, monensin, salinomycin, narasin, lasalocid, and maduramicin in chicken liver using liquid chromatography mass spectrometry sequence (LC-MS/MS)

The method developed was performed according to the criteria 2002/657/EC established by the European Union and revealed to be selective, specific and robust. The recoveries values obtained for the compounds studied were higher than 90% and lower than 102%, for the maximum criteria of 80 to 110%, except for monensin and salinomycin where the maximum criteria used was from 70 to 100%.

Nicarbazine was the most reproducible compound with a 13.48% of variation coefficient, CV. All results obtained were lower than the calculated values using Horwitz equation for each LMR. The decision limit ($CC\alpha$) and detection limit ($CC\beta$) values ranged from 2.5 $\mu\text{g/kg}$ to 4.5 $\mu\text{g/kg}$ for maduramicin and from 108 $\mu\text{g/kg}$ to 144 $\mu\text{g/kg}$ for nicarbazine. It is possible to conclude, following the validation of the results obtained, that the methodology developed in this project allows successful analytical detection of the above-mentioned coccidiostats in animal liver samples.

Key-words

Coccidiosis, coccidiostats, robenidine, halofuginone, diclazuril, nicarbazin, monensin, salinomycin, narasin, lasalocid, maduramicin, LC-MS-MS, validation.

ÍNDICE

Agradecimentos	ii
Abreviaturas	iii
Resumo	v
Palavras-chave	vi
Abstract	vii
Key-words	vii
ÍNDICE	viii
1. Objectivo	1
2. Introdução	2
2.1- Coccidiose e coccidistáticos.....	2
2.2. Regulamentação	7
2.3. Determinação analítica	14
2.3.1 Extracção	14
2.3.2 Detecção e quantificação	15
3. Validação da Metodologia Analítica- critérios e requisitos de desempenho	18
3.1.Aplicabilidade e Robustez	21
3.2. Especificidade /selectividade.....	21
3.3.Veracidade /Recuperação	22
3.4. Precisão	23
3.5 Limite de decisão, CC α :	24
3.6.Capacidade de detecção, CC β :.....	25
4. Material e Métodos	27
4.1. Equipamento e material.....	27
4.2. Reagentes e padrões	27
4.3. Soluções.....	27
4.3.1. Soluções gerais	28
4.3.2. Soluções padrão.....	28
4.3.2.1.	28
4.3.2.2.	28

4.3.2.3.	28
4.3.2.4.	28
4.3.2.5.	29
4.3.2.6.	29
4.3.2.7.	29
4.3.2.8.	29
4.4. Procedimento experimental.....	29
4.4.1. Optimização das condições experimentais do detector de massa MS/MS.	29
4.4.2. Condições cromatográficas	31
4.4.3. Extração	33
4.5. Validação.....	34
4.5.1. Selectividade, Especificidade e Aplicabilidade	35
4.5.2. Estudo da Veracidade/Recuperação	36
4.5.3. Estudo da Precisão	36
4.5.4. Estudo CC α e CC β	36
5. Apresentação e Discussão dos Resultados	37
5.1. Critérios de Validação	47
5.1.1. Selectividade, Especificidade e Aplicabilidade	48
5.1.2. Rectas de calibração	48
5.1.3. Recuperação	51
5.1.4. Precisão	55
5.1.4.1. Repetibilidade.....	55
5.1.4.2. Reprodutibilidade.....	57
5.1.5. Limite de Decisão e Capacidade de Detecção.....	59
6. Conclusões e perspectivas futuras.....	62
7. Referências Bibliográficas	64
8. Anexos	

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias proibidas e não autorizadas (grupo A); Medicamentos com LMR e contaminantes ambientais (Grupo B)	9
Tabela 2 - LMR para cada CCD, por espécie e tecidos, de acordo com os diversos regulamentos.....	10

Tabela 3 - Métodos analíticos e respectivas características de desempenho que devem ser determinadas [13].....	19
Tabela 4 - Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas das transições iónicas para metodologias por LC-MS/MS. [13]	19
Tabela 5 - Intervalo de veracidade mínima dos métodos quantitativos.	23
Tabela 6 - Fragmentos iónicos, modo de ionização e energias de colisão mais favoráveis para cada um dos compostos.....	30
Tabela 7 - Parâmetros otimizados da fonte de ionização	31
Tabela 8 - Condições cromatográficas	31
Tabela 9 - Gradiente da fase móvel para detecção por MS com ionização em modo positivo (ESI+)	32
Tabela 11- Tempos de retenção e tempos de retenção relativos dos CCDs	32
Tabela 12 - Limite máximo de resíduos para os CCDs em fígado de frango	33
Tabela 13 - Volume da solução de trabalho de LMR de CCDs e dos PI adicionados em função da concentração pretendida	35
Tabela 14- Análises efectuadas para os diversos estudos de validação.....	36
Tabela 6 - Fragmentações obtidas m/z para os CCDS	40
Tabela 16 - Intensidade de área obtida para a NIG no dia 1 nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 150 µg/Kg.....	48
Tabela 17 - Intensidade de área obtida para a NIG no dia 2 nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 150 µg/Kg.....	49
Tabela 18 - Intensidade de área obtida para a NIG no dia 3 nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 150 µg/Kg.....	49
Tabela 7- Equações e correlação linear de análises efectuadas em 3 dias para os compostos DCZ, RBD, HFG, LSD, MDM, MSN, NRS, DNC e SLM.	50
Tabela 20- Resultados obtidos para amostras fortificadas com NRS a 0,5, 1 e 1,5 LMR	52
Tabela 21- Resultados da recuperação para o composto NRS	52
Tabela 22- Resultados de percentagem de recuperação e critério máximo permitido para os compostos DCZ, RBD, HFG, LSD, MDM, MSN, NRS, DNC e SLM. Erro! Marcador não definido.	
Tabela 23 - Coeficiente de variação e coeficiente de variação de Horwitz obtido para o composto NRS	55
Tabela 24 - Resultados de repetibilidade do método e critério máximo aplicado para os compostos DCZ, RBD, HFG, LSD, MDM ,MSN, NRS, DNC e SLM Erro! Marcador não definido.	

Tabela 25- CV do método e CV de Horwitz obtidos para o composto NRS para concentrações de 25,00, 50,00 e 75,00 µg/Kg	57
Tabela 26 - Resultados obtidos para a reprodutibilidade do método e critério máximo aplicado para os compostos DCZ, RBD,HFG, LSD, MDM, MSN, NRS, DNC e SLM.....	58
Tabela 27-Resultados obtidos para a concentração de 50 µg/Kg de NRS	59
Tabela 28- Resultados obtidos dos parâmetros CC α e CC β para os compostos DCZ, RBD,HFG, LSD, MDM ,MSN, NRS, DNC e SLM.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas químicas dos coccidiostáticos ionóforos e químicos.....	6
Figura 2- Forma de medição dos sinais a considerar na validação (sR corresponde à amplitude do ruído de fundo na ausência do analito e sA corresponde à amplitude/intensidade do sinal do analito). Adaptado de Manual de procedimentos técnicos PO-013-HP/BR [51].....	20
Figura 3- Cromatogramas mostrando os picos obtidos para o composto NRS em LC-MS.....	38
Figura 4- Cromatogramas mostrando os picos obtidos para o composto NRS em LC-MS/MS	39
Figura 5- Cromatogramas das transições iônicas monitorizadas em modo ESI (+) dos compostos HFG, RBD, LSD, MSN, SLM, NRS, MDM e NIG (PI).....	46
Figura 6- Cromatogramas das transições iônicas monitorizadas em modo ESI (-) dos compostos DNC, DCZ e DNC-d8 (PI).	47
Figura 7- Recta de calibração do composto narasina, com a razão das áreas no eixo das ordenadas (y) e a concentração de narasina no eixo das abcissas (x).....	50

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

[eq. 1]	20
[eq. 2]	22
[eq. 3]	24
[eq. 4]	24

1. Objectivo

Os medicamentos veterinários têm diversas aplicações em produção intensiva de animais para consumo humano. Alguns compostos são adicionados como suplementos na alimentação animal nomeadamente os coccidiostáticos. Estes compostos são substâncias usadas como aditivos alimentares, promotores de crescimento e para prevenção e tratamento de coccidiose, uma doença infecciosa causada por protozoários do género *Eimeria*. O parasita *Eimeria* encontra-se disseminado no ambiente, podendo ser transmitido na sua forma latente por vermes e aves, e é muito tolerante às variações das condições meteorológicas e a desinfectantes, o que torna praticamente impossível a sua erradicação [1- 4]. Os principais grupos de animais onde se deve utilizar medidas de controlo para a coccidiose são aves de capoeira, perus e coelhos por serem as espécies mais susceptíveis à infecção.

O objectivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de um procedimento analítico robusto e eficaz para detecção e quantificação simultânea da presença de resíduos de monensina, salinomicina, narasina, lasalocida, maduramicina, robenidina, halofuginona, diclazuril e nicarbazina, esta última na forma de dinitrocarbanilida em amostras de fígado de origem animal, pois este é um órgão de metabolização dos compostos no organismo sendo por isso dos principais tecidos edíveis analisados na pesquisa de resíduos. O método desenvolvido destina-se a ser aplicado em análises de rotina levadas a cabo no laboratório de análise de resíduos do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P no âmbito do Plano Nacional de Controlo de Resíduos. .

2. Introdução

2.1- Coccidiose e coccidistáticos

Os medicamentos veterinários são compostos amplamente utilizados em todos os países, nos sistemas de produção animal para profilaxia e terapia de patologias e como promotores de crescimento. Estes compostos são adicionados como suplementos na alimentação animal.

Os animais que ingerem promotores de crescimento necessitam de menor quantidade de alimento para produzirem maior quantidade de carne, desenvolvendo-se mais rapidamente. O efeito dos promotores de crescimento deve-se, provavelmente, à diminuição da flora intestinal normal e das bactérias patogénicas [1,2]. No caso em que os promotores de crescimento são antibióticos, estes contribuem para o aumento do peso do animal em virtude de pequenas doses de antibiótico inibirem o metabolismo da flora intestinal, a qual compete com o hospedeiro para os nutrientes. O consumo de aminoácidos por estas bactérias diminui, ocorrendo simultaneamente menor produção de moléculas tóxicas, como por exemplo, amoníaco. A redução das bactérias patogénicas é um outro factor que permite um maior desenvolvimento dos animais, dado que a sua presença pode diminuir o crescimento devido a doença subclínica [3].

Entre os compostos incluídos na presente abordagem, os coccidiostáticos são um grupo de compostos utilizados como aditivos alimentares para a prevenção e tratamento de coccidiose, uma doença infecciosa causada por protozoários do género *Eimeria*, classe *Sporozoa* 2, (*phylum* Apicomplexa). A coccidiose incide especialmente em aves de capoeira, perus e coelhos, sendo neste grupo sensível de animais que se devem utilizar medidas de controlo a fim de prevenir esta doença mortal [4]. São sete as principais espécies de *Eimeria* que afectam as aves de capoeira (*E. acervulina*, *brunetti*, *mitis*, *necatrix*, *praecox*, *tenella* e *maxima*), outras cinco são específicas de perus (e.g. *E. meleagrimitis*) e seis de coelhos (e.g. *E. stiedae*).

O parasita *Eimeria* encontra-se disseminado no ambiente, podendo ser transmitido na sua forma latente por vermes e aves, sendo muito tolerante às variações das condições meteorológicas e aos desinfectantes, o que torna praticamente impossível a sua erradicação. Uma vez ingerido, permanece no tracto gastrointestinal, principalmente no intestino, reproduzindo-se e excretando protozoários sob a forma de oocistos esporulados. Um oocisto consiste num zigoto, resultante da fusão de um macro e microgâmeta, revestido por uma

membrana espessa. Esta célula inicia um processo de divisão interna, assexuada, designado por esporulação, de que resultam um número variável de células organizadas em esporocistos. A infecção ocorre por ingestão pelos animais a partir do ambiente contaminado [5]. Na ausência de tratamento, o quadro clínico pode incluir uma perda de peso por menor ingestão de alimento devido a inflamação intestinal, enterotoxemia e morte, dependendo da gravidade da infecção e das espécies implicadas. Mesmo em casos de infecção ligeira, as lesões intestinais podem potenciar outras infecções microbianas agravando o estado de saúde do animal. Devido à facilidade de contaminação dos animais as perdas económicas podem ser grandes, pelo que a prevenção pelo uso de anticoccidianos é fundamental [3,4,6].

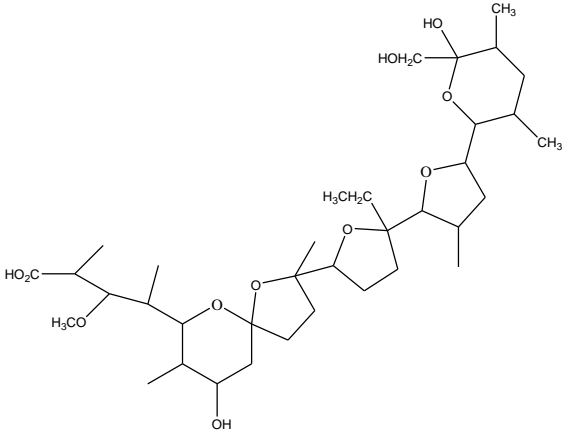
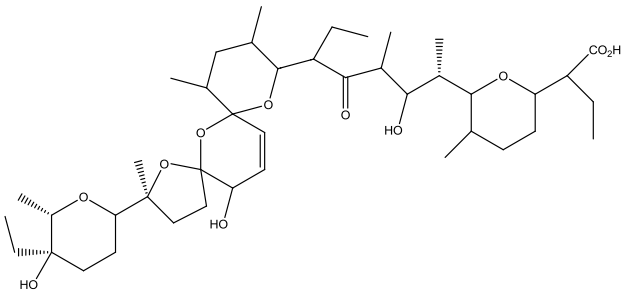
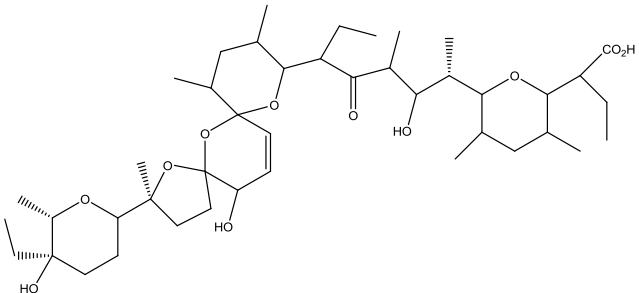
O principal método de controlo da coccidiose consiste na adição de coccidiostáticos à alimentação dos animais nos níveis autorizados em cada país e no cumprimento dos requisitos de higiene prescritos. Em geral, os coccidiostáticos têm de ser administrados ao longo da vida do animal (no caso dos frangos de engorda), a fim de o protegerem contra a reinfecção decorrente da onipresença do estágio oocístico da doença.

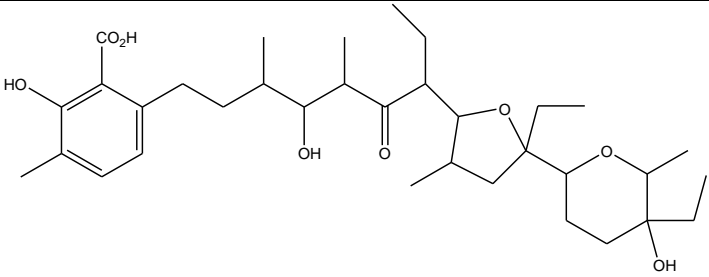
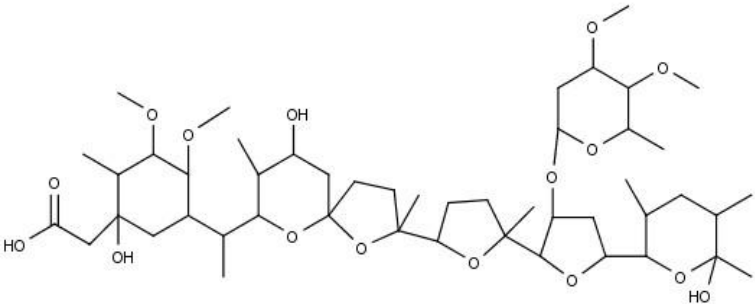
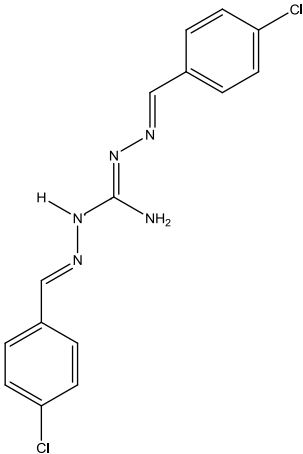
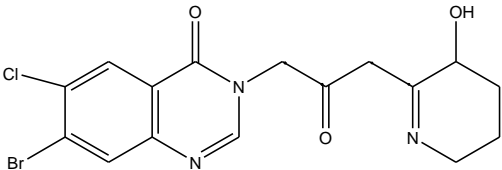
Os principais compostos anticoccidianos utilizados como aditivos para alimentação animal são divididos em duas classes, os sintetizados quimicamente e os ionóforos (antibióticos carboxílicos de poliéteres) naturalmente produzidos por fermentação de diversas estirpes de *Streptomyces spp* e *Actinomadura spp* [3].

Os compostos monensina (1), salinomicina (2), narasina (3), lasalocida (4) e maduramicina (5) são coccidiostáticos ionóforos (fig.1). A estrutura química destes compostos consiste em vários éteres cíclicos, um grupo ácido carboxílico livre numa das extremidades da molécula e um grupo álcool na outra extremidade. São denominados antibióticos poliéteres e podem formar pseudomacrociclicomplexos com cations alcalinos. São substâncias que apresentam afinidade com cations tais como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , servindo como um veículo de transporte para estes iões através de membranas celulares, sendo esta a base da sua actividade biológica. No entanto a afinidade e selectividade dos vários coccidiostáticos para cada cation é diferente. A monensina apresenta uma maior afinidade pelo cation sódio do que para cation potássio e não se liga a iões bivalentes em grande extensão. Pelo contrário a salinomicina tem maior afinidade para o potássio do que para o sódio, tendo também pouca afinidade por iões bivalentes. A lasalocida é menos específica e apresenta afinidade pelos cations sódio, potássio e cations bivalentes.

Os coccidiostáticos químicos são produtos sintéticos de natureza não ionófora (fig.1): robenidina (6) (grupo químico das guanidinas), halofuginona (7) (grupo químico das

quinazolinonas), diclazuril **(8)** (grupo químico dos benzeno-acetonitrilos) e nicarbazina [4]. Nicarbazina é o nome genérico para o complexo de 4,4-dinitrocarbanilida (DNC) e 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina (HDP) na proporção molar 1:1. Estudos de toxicocinética demonstraram que DNC **(9)** é um resíduo mais persistente do que HDP, sendo portanto o composto DNC objectivo de análise.

Natureza química	Nome	Estrutura
Ionóforos	Monesina (1)	
	Salinomicina (2)	
	Narasina (3)	
	Lasolacida (4)	

		
	Maduramicina (5)	
Químicos	Robenidina (6)	
	Halofuginona (7)	
	Diclazuril (8)	

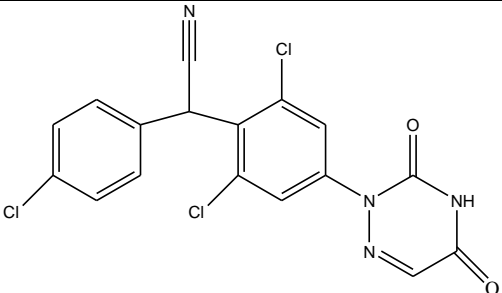
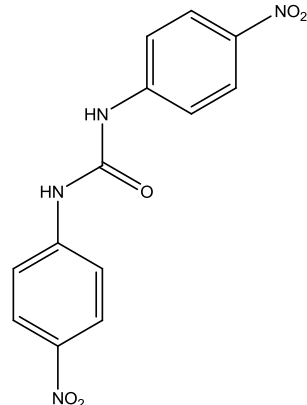
		
	Dinitrocarbanilid a (9)	

Figura 1- Estruturas químicas dos coccidiostáticos ionóforos e químicos

Todos os CCDs são inibidores da reprodução do parasita, sem o eliminarem completamente do intestino do animal. Por conseguinte, os produtos químicos sintéticos em conjunto com os ionóforos autorizados desempenham um papel vital, tornando possível a rotação ou a substituição dos produtos em cada novo ciclo de produção de modo a garantir um controlo adequado da patologia e minimizando o desenvolvimento da imunidade do parasita [4]. A disponibilidade e a utilização contínua de CCDs com fins preventivos contribuiu significativamente para o desenvolvimento da produção de aves de capoeira proporcionando aos animais um nível elevado de saúde e bem-estar.

A introdução do primeiro coccidiostático ionóforo, a monensina, nos anos setenta do século passado, representou um progresso significativo no controlo da coccidiose. Anteriormente, os surtos de coccidiose eram frequentes e mais difíceis de tratar ou de prevenir, uma vez que só se dispunha de coccidiostáticos não ionóforos, cuja eficácia era muito inferior pelo facto do parasita se tornar rapidamente imune aos mesmos.

2.2. Regulamentação

A legislação comunitária impõe regras muito restritas na utilização de medicamentos veterinários pelos produtores de animais destinados ao consumo humano, sendo a regulação de resíduos de medicamentos em alimentos derivados de animais uma componente integrante de programas de segurança alimentar em todo o mundo [7,8,9]. A presença de resíduos indesejáveis em produtos para consumo humano pode ser o resultado da utilização ilegal, no caso de medicamentos proibidos, ou no caso de medicamentos autorizados do desrespeito dos intervalos de segurança. O aumento dos casos de reações alérgicas aos antibióticos, além da crescente preocupação com o surgimento da resistência aos antibióticos pelos microrganismos patogénicos são factores importantes para a fixação de limites máximos de resíduos nos alimentos. Define-se como resíduo de um medicamento veterinário todas as substâncias farmacologicamente activas (princípios activos, excipientes ou produtos de degradação) que permaneçam nos produtos alimentares obtidos a partir de animais a que se administrou um medicamento veterinário [4].

Nos últimos 40 anos, a coccidiose nos animais de criação foi controlada através da adição de substâncias à respectiva alimentação, tendo a Comunidade Europeia regulado e autorizado, a partir de 1970, a utilização de CCDs como aditivos destinados à alimentação animal ao abrigo da Directiva 70/524/CEE, de 23 de Novembro de 1970 [10], relativa aos aditivos na alimentação para animais [3,4,11]. Esta directiva foi inteiramente revista em 2003, tendo o Regulamento (CE) n.º 1831/2003 [11] representado uma alteração da legislação em vigor na UE no que respeita aos aditivos destinados à alimentação animal. Este regulamento introduziu novos aspectos na legislação, tendo sido um dos primeiros diplomas legislativos em matéria de segurança dos alimentos adoptados no seguimento do Regulamento (CE) n.º 178/2002 [7] que determina os princípios e as normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.

Para além de delegar a responsabilidade da avaliação da segurança e da assistência científica à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, o Regulamento (CE) n.º 1831/2003 [11] reviu os princípios estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 178/2002 [7] mediante a introdução da concessão de autorizações por períodos limitados, válidas por um período de 10 anos, a criação de um laboratório comunitário de referência para os aditivos destinados à

alimentação animal, a possibilidade de estabelecer limites máximos de resíduos (LMR) para certos aditivos susceptíveis de dar origem a resíduos quando adicionados aos alimentos [12], e a possibilidade de elaborar um plano de monitorização pós-comercialização aquando da autorização, entre outras disposições.

O regulamento (CE) n.º1831/2003, actualmente em vigor, manteve os CCDs, prevendo todavia a supressão gradual da utilização dos antibióticos existentes como aditivos alimentares a partir de 1 de Janeiro de 2006, tendo em conta os riscos de selecção de estirpes bacterianas resistentes a medicamentos para uso humano ou veterinário ao utilizar agentes antimicrobianos como promotores de crescimento [4].

O Regulamento 2377/90/EC [4], revogado pelo regulamento CE n.º 470/2009 previu um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos (LMR) de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. Este regulamento define o LMR como a concentração máxima de resíduos resultantes da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg/kg ou µg/kg de peso fresco) que a Comunidade pode aceitar como legalmente autorizada ou que é reconhecida como aceitável à superfície ou no interior de um alimento. Neste regulamento estão incluídos quatro anexos que abrangem as substâncias farmacológicas: substâncias para as quais foram fixados LMR (Anexo I), substâncias para as quais não é considerado necessário estabelecer LMR (Anexo II), substâncias com valores provisórios de LMR (Anexo III) e substâncias para as quais o LMR não pode ser estabelecido pelo que são substâncias proibidas (Anexo IV).

De acordo com esta legislação [13], os medicamentos veterinários são divididos em dois grandes grupos:

Grupo A: constituído por substâncias proibidas, que demonstram efeito anabolisante, e não autorizadas de acordo com a Directiva 96/22 e Anexo IV do Regulamento 2377/90;

Grupo B: constituído por substâncias autorizadas sujeitas a determinadas restrições e contaminantes ambientais. Este inclui todos os medicamentos veterinários, em conformidade com os Anexos I e III do Regulamento 2377/90 e contaminantes ambientais, tais como produtos fitossanitários, metais pesados, corantes ou micotoxinas.

A tabela 1 especifica as classes de compostos pertencentes aos grupos A e B de acordo com a legislação atrás referida.

Tabela 1 - Substâncias proibidas e não autorizadas (grupo A); Medicamentos com LMR e contaminantes ambientais (Grupo B)

Composto ou Grupo		Medicamentos com LMR		Contaminantes Ambientais	
Grupo A	Proibidos e Não Autorizados	Grupo 1B	Antimicrobianos	Grupo 2B	Organoclorados
	Estilbenos		Antihelmínticos		Organofosforados
	Tireostáticos		Coccidiostáticos		Elementos químicos
	Esteroides		Carbamatos e piretroides		Micotoxinas
	RAL's		Tranquilizantes		Corantes
	Beta-agonistas		AINÉ's		
	Cloranfenicol		Corticosteroides		
	Nitrofuranos				
	Nitroimidazois				

De acordo com a legislação, os CCDs são compostos pertencentes ao Anexo I, e ao grupo B [4]. Os vários CCDs têm LMR diferentes entre si, e para o mesmo CCD os LMR são diferentes para cada espécie e tecidos ou produtos edíveis (tabela 2) [13- 25].

Tabela 2 - LMR para cada CCD, por espécie e tecidos, de acordo com os diversos regulamentos

	Regulamento 37/2010	Regulamento 124/2009 e 610/2012	Outros regulamentos	
Lasalocida (µg/Kg)	<div>Frangos</div> <div>músculo20</div> <div>gordura100</div> <div>figado100</div> <div>rim50</div> <div>ovos150</div>	<div>outras espécies</div> <div>leite1</div> <div>figado50</div> <div>rim20</div> <div>outros5</div>	<div>Bovinos</div> <div>músculo10</div> <div>gordura20</div> <div>figado100</div> <div>rim20</div> <div>regulamento 86/2012</div>	
Narasina (µg/Kg)		<div>todos animais excepto frango de engorda</div> <div>ovos2</div> <div>leite1</div> <div>figado50</div> <div>outros5</div>	<div>Frangos de engorda</div> <div>figado50</div> <div>rim50</div> <div>músculo50</div> <div>gordura50</div> <div>regulamento 885/2010</div>	
Salinomicina (µg/Kg)		<div>todos animais excepto frango e coelhos de engorda</div> <div>ovos3</div> <div>figado5</div> <div>outros2</div>	<div>Frangos de engorda</div> <div>todos os tecidos frescos5</div> <div>regulamento 496/2007</div>	

Monensina (µg/Kg)	Bovinos músculo 2 gordura 10 fígado 30 rim 2 leite 2	todos animais excepto frango de engorda, peru e bovino fígado 8 outros 2	Frangos de engorda, frangas de postura e peru fígado 8 rim 8 músculo 8	Bovinos músculo 2 gordura 10 fígado 50 rim 10 leite 2
			regulamento 1096/2008	regulamento 59/2013
Maduramicina (µg/Kg)		todos animais excepto frango de engorda e peru ovos 12 outros 2	Frangos de engorda fígado 150 rim 100 músculo 30	
			regulamento 388/2011	
Robenidina (µg/Kg)		todos animais excepto frango de engorda, peru e coelhos de engorda e reprodução ovos 25 fígado 50 rim 50 gordura 50 outro 5	Coelhos reprodutores e de engorda fígado 200 rim 200 outros 100 tecidos 100	
			regulamento 532/2011	
Halofuginona (µg/Kg)	Bovinos músculo 10 gordura 25 fígado 30 rim 30	todos animais excepto frango de engorda, peru e bovino ovos 6 fígado 30 rim 30 leite 1 outros 3		

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA) avalia criteriosamente a inocuidade dos CCDs actualmente autorizados, pela imposição de fiscalização do cumprimento dos LMR de CCDs no mercado Europeu [26]. Esta avaliação realizada pelo Painel dos aditivos e produtos ou substâncias utilizados na alimentação animal (FEEDAP) abrange a inocuidade para os animais, os consumidores e os utilizadores, bem como para o ambiente. No âmbito desta avaliação, também é estudado o risco de aparecimento de imunidade nos protozoários e de resistência cruzada nos microrganismos, a fim de se evitar um possível desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos utilizados em medicina humana ou veterinária, desconhecida até hoje.

O facto de o Regulamento (CE) n.º 1831/2003 prever a fixação de LMR para os resíduos dos aditivos nos géneros alimentícios de origem animal implica que devem de estar disponíveis métodos eficazes e claros para controlar a utilização dos CCDs na alimentação animal.

Nos termos do Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de Janeiro de 2003, que estabelece requisitos de higiene dos alimentos para animais, os estabelecimentos que produzam ou coloquem no mercado CCDs em pré-misturas de alimentos compostos (completos ou complementares) para animais, devem ser aprovados pelas autoridades competentes para o exercício das actividades em causa [27, 28]. Na prática, estas disposições significam que, regra geral, os agricultores que pretendam utilizar CCDs só poderão obter os alimentos prontos a usar junto de fabricantes devidamente aprovados.

Vestígios indesejados de CCDs em rações podem ocorrer em todas as fases de produção dos alimentos para animais e durante a armazenagem e transporte dos mesmos. Na linha de produção, as rações podem ter de ser fabricadas uma após outra pelo que vestígios inevitáveis de alguns CCDs podem permanecer na linha contaminando-a [29,30]. A contaminação inevitável em alimentos para animais não alvo por substâncias activas como os CCDs pode dar origem à presença destes como contaminantes em alimentos derivados. Um exemplo é a presença de resíduos de nicarbazina em tecidos e ovos de aves de capoeira devido ao facto deste composto ser fortemente eletrostático contaminando as linhas produção [31].

Aliás, a contaminação cruzada tem sido um dos argumentos das autoridades para as diversas alterações na legislação dos LMR dos diferentes CCDs e do estabelecimento de LMR para matrizes como ovos e rações [32- 35].

As diretrizes técnicas 96/23/CE [13] e 96/22/CE [12] são descritas na Decisão da Comissão 2002/657/CE [14] para controle de resíduos de medicamentos veterinários em animais e seus produtos e contêm os procedimentos detalhados para estados membros da UE definirem os planos de controlo nacionais, incluindo detalhes sobre os procedimentos de amostragem como o desempenho analítico e procedimentos de validação dos métodos. Ao contrário da maioria dos países fora da UE, não há obrigação de utilizar métodos oficiais no controle de resíduos de produção animal. Em vez disso aplica-se uma abordagem que estabelece critérios de desempenho que incluem características e limites para identificação e quantificação e que devem ser cumpridos pelos métodos usados [36]. A vantagem significativa desta abordagem é o elevado grau de flexibilidade, que permite a adaptação de métodos analíticos à evolução técnica e oferece a possibilidade de reagir rapidamente a problemas emergentes, tais como, por exemplo no caso de combinações analito/ matriz que não tenham sido consideradas. Exemplos recentes são a presença de cloranfenicol no mel e acetato de medroxiprogesterona em melaço, produtos para os quais não existiam limites máximos de resíduos estipulados na legislação [37].

O plano de vigiância que assegura o cumprimento da legislação sobre resíduos é o Plano Nacional de Controlo de Resíduos, PNCR, obrigatório em todos os Estados- membros da União Europeia. O referido plano abrange controlo analítico nos animais vivos, fluidos biológicos, ração e água de bebida colhidas nas explorações e os tecidos edíveis recolhidos nos matadouros. Neste plano, leite, ovos e mel são também matrizes a analisar.

No caso dos CCDs, uma vez que são compostos sujeitos a LMR, cuja legislação tem vindo a ser alterada na UE (tabela 2), o controlo tem de utilizar metodologias analíticas que os identifiquem e quantifiquem [38].

2.3. Determinação analítica

2.3.1 Extracção

Diversas metodologias analíticas têm sido desenvolvidas para a determinação de um ou mais CCDs em diversas matrizes.

Num processo analítico, os resultados de uma análise quantitativa só serão confiáveis se a porção da amostra submetida ao processo analítico representar, com suficiente exatidão, a

composição média da amostra. Deste modo, a amostragem é uma abordagem analítica a ter em consideração.

Um dos processos fundamentais numa análise química é a extracção dos analitos da matriz devendo evitar-se alterações de matriz e co-extracção de compostos que possam interferir na análise. Numa extracção deve-se obter a maior quantidade possível dos compostos a analisar, evitar perdas e realizar um processo de limpeza de extracto, “clean-up”, para eliminar possíveis interferentes. Existem diversos procedimentos descritos para extracção de CCDs em diversas matrizes, mas alguns deles são limitantes em relação ao número de compostos extraídos, e portanto à análise simultânea de CCDs.

Um dos método mais usados para detecção e quantificação de analitos é a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS). Quando se analisam por esta técnica compostos presentes em matrizes complexas, como é o caso do fígado, pode ocorrer supressão iónica provocada por analitos interferentes, provenientes da matriz. Compostos que sejam menos voláteis podem alterar a quantidade de iões em fase gasosa que entram no detector de massa, alterando a capacidade de detecção do analito e repetibilidade dos resultados e podendo diminuir a resolução de espectros.

Pelos factores referidos anteriormente, a extracção e a limpeza do extracto da amostra são essenciais no processo analítico.

Os processos de extracção têm em conta as propriedades físico-químicas dos compostos de interesse sendo o acetonitrilo considerado um dos solventes que promove uma extracção bastante eficiente, com uma elevada recuperação. Por exemplo, um estudo de 2012 realizado por Mary Moloney *et al.* refere a determinação de vinte CCDs em ovos e tecido muscular de frangos usando acetonitrilo para a extracção simultânea dos compostos [39].

2.3.2 Detecção e quantificação

Métodos de rastreio aplicados a vários tecidos edíveis e baseados em imunoensaios enzimáticos têm sido amplamente descritos. Foram desenvolvidos anticorpos para diversos CCDs para aplicação destes métodos imunológicos [38, 40].

O uso destas metodologias tem vantagens tais como a possibilidade de analisar um número elevado de amostras rápida e facilmente, e a baixo custo [38]. Como desvantagens, pode apontar-se o facto de serem pouco específicos e selectivos, não permitindo, regra geral, identificar o composto presente, mas, somente o grupo químico a que esse composto pertence,

bem como a existência da possibilidade de reacções cruzadas com outros compostos quimicamente semelhantes ou presentes em grandes quantidades. Uma outra desvantagem prende-se com o facto unicamente de serem apenas semi-quantitativos, não permitindo uma quantificação exacta dos analitos presentes, facto inultrapassável para compostos com limites definidos. Por este motivo, quando se monitoriza a presença deste tipo de compostos deve-se confirmar e quantificar a presença de CCDs utilizando métodos mais específicos, exigidos nos critérios de identificação da legislação, nomeadamente métodos cromatográficos [14].

A cromatografia em camada fina (CCF) foi inicialmente utilizada na análise qualitativa como técnica de rastreio devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo. O recurso a reagentes de pulverização que possibilitam uma dupla identificação dos compostos, pelo factor de retenção e pela cor possibilitando a exclusão de falsos negativos. A desvantagem nesta técnica é que não possibilita uma quantificação exacta, mesmo com o recurso a densitómetros demonstrando, igualmente, falta de sensibilidade aos níveis desejados [37]. Assim na análise qualitativa e quantitativa de diversos compostos em simultâneo numa única etapa de análise, usa-se geralmente a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência.

No controlo analítico de coccidiostáticos é exigida a sua análise em matrizes complexas a nível de concentração extremamente baixos, o que obriga a uma preparação prévia da amostra seguida da separação, detecção, quantificação e confirmação dos analitos. Em geral, a determinação de compostos orgânicos é efectuada por cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida (LC), dependendo da polaridade dos analitos, volatilidade e risco de decomposição a temperaturas elevadas. Os compostos orgânicos voláteis ou semivoláteis podem ser analisados por GC. Por seu lado, os compostos polares ou não polares termossensíveis podem ser analisados por LC, sem necessidade de derivatização. No caso de se quererem analisar simultaneamente vários resíduos, as características dos métodos usados diferem de acordo com o objectivo com que são empregados. Por exemplo, um método que se destine a verificar o cumprimento de LMR deve contemplar um conjunto de analitos para os quais esses requisitos estejam legalmente fixados, em determinadas matrizes, e apresentar características de funcionamento compatíveis com o definido na legislação.

No caso da cromatografia líquida, os detectores mais usados são o detector de ultravioleta-visível (UV-Vis), o detector de fluorescência, e o detector de massa. A utilização de HPLC com detecção por UV-Vis ou fluorescência foi vastamente usada, devido a sua especificidade, na detecção de CCDs com a vantagem de permitir a quantificação dos compostos, em níveis de

concentração baixos, principalmente no caso de detecção por fluorescência. Como exemplo pode apontar-se um método descrito na literatura para a determinação de resíduos de DNC em fígado de frangos com recurso à técnica de HPLC com detecção por UV-Vis [41].

A necessidade de análise de matrizes cada vez mais diversificadas e complexas como rações e amostras biológicas (tais como urina, cabelo ou alimentos) para a detecção de resíduos de CCDs, implicaram que cada vez mais metodologias de cromatografia selectivas tivessem de ser desenvolvidas e com limites de detecção cada vez mais baixos [38]. Por estes factos, os sistemas de detecção acoplados à cromatografia por UV e fluorescência têm vindo a ser abandonados, devido à falta de grupos químicos presentes nas estruturas químicas dos ionóforos que absorvam nessa zona de radiação, sendo necessária uma derivatização dos extractos, tornando a análise mais complexa, mais permissiva a erros e mais limitada a nível da diversidade e capacidade de detecção.

Para cumprir os critérios de desempenho requeridos pela legislação [14] a espectrometria de massa, (MS), tem-se revelado uma técnica preferencial de detecção devido ao elevado grau de certeza em relação à identificação e quantificação do analito e à sua elevada capacidade de detecção [42]. Em modo LC/MS obtém-se grande abundância de informação qualitativa, enquanto que em modo de monitorização selectiva de iões (SIM) perde-se informação qualitativa mas a sensibilidade é melhorada, razão pela qual é mais apropriada para análise quantitativa. A utilização de LC-MS/MS possibilita o controlo do ião molecular e de transições iónicas provenientes da fragmentação do mesmo. Esta possibilidade de monitorizar mais do que um ião permite uma identificação inequívoca do composto em análise. Deste modo, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC / MS), e a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (LC /MS / MS) têm sido as técnicas mais amplamente usadas na detecção e quantificação de coccidiostáticos[43].. Os princípios de monitorização selectiva de iões (SIM) ou de monitorização de reacções múltiplas (MRM) propicia a sensibilidade e especificidade necessárias para a quantificação de analitos, presentes em matrizes de elevada complexidade em concentrações vestigiais [10]. A introdução de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ionização por eletronebulização (electrospray ionization, ESI) permitiu o emprego da técnica LC-MS/MS na determinação de resíduos de medicamentos veterinários de elevado peso molecular e termossensíveis [44].

Entre os diferentes analisadores de massa aplicados para análise, o triplo quadrupolo (QQQ) é o mais utilizado para os resíduos de medicamentos veterinários [34].

Os CCDs químicos e os ionóforos são geralmente ionizados por “electrospray” em modo positivo e os compostos diclazuril e nicarbazina são ionizados em modo negativo [34]. A técnica analítica LC/ESI-MS/MS, com ionização por electrospray, tem sido descrita para a determinação de alguns CCDs individuais ou em amostras com multiresíduos. Esta técnica foi, por exemplo, aplicada na detecção de CCDs individuais em plasma, matriz onde as concentrações estão em valores vestigiais, pelo que os métodos têm de ser sensíveis para a sua quantificação [45].

Vários autores descreveram métodos multi-resíduos, por LC-MS/MS que permitiram a detecção e quantificação simultânea de diversos CCDs em rações, e ovos [5, 41, 42, 46, 47, 48]. Małgorzata Olejnik *et al.*, 2009, determinaram 12 CCDs em fígado, num método multi-resíduos usando a técnica LC-MS/MS. Neste trabalho a extracção dos compostos foi realizada com o solvente acetonitrilo e a limpeza do extracto foi feita em coluna Oasis HLB. A fase móvel do sistema LC-MS/MS consistiu num gradiente de 3 fases móveis: acetonitrilo, metanol e tampão formato de amónio 0.01M, pH 4.0. [49]

3. Validação da Metodologia Analítica- critérios e requisitos de desempenho

A validação de um método analítico pode ser definida como o processo de avaliação da eficiência de um método analítico novo ou adaptado de método conhecido, em análise de rotina de um laboratório. O objectivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos [50].

Toda a validação analítica a ser usada no presente estudo baseia-se nos critérios de desempenho e procedimentos para a validação de métodos de triagem e de confirmação em cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa estabelecidos na decisão da comissão 2002/657/CE [13].

Quando se pretende a confirmação da presença do composto, a capacidade de detecção ($CC\beta$), limite de decisão ($CC\alpha$), veracidade, precisão, selectividade e especificidade, aplicabilidade, robustez e estabilidade, têm de representar as características de desempenho do método analítico. A tabela 3 resume os critérios definidos para os métodos qualitativos e quantitativos [13].

Tabela 3 - Métodos analíticos e respectivas características de desempenho que devem ser determinadas [13].

		Limite de detecção CC β	Limite de decisão CC α	Veracidade/ Recuperação	Precisão	Selectividade/ specificidade	Aplicabilidade/ Robustez/ Estabilidade
Métodos Qualitativos	T	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Métodos Quantitativos	T	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+
T = Método de triagem; C = Método de confirmação; + = A determinação é obrigatória							

Numa análise por LC-MS/MS os resultados obtidos são cromatogramas e no caso de espectrometria de massa deve ser analisada a presença do ião molecular e de transições iónicas provenientes da sua fragmentação.

Os critérios de desempenho aplicáveis à detecção por espectrometria de massa baseiam-se na variação permitida nos tempos de retenção relativos e nas razões iónicas de cada substância, calculadas entre diferentes ensaios e cujas tolerâncias estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Tolerâncias máximas permitidas para as intensidades relativas das transições iónicas para metodologias por LC-MS/MS. [13]

Intensidade relativa	Tolerância relativa
>50%	± 20%
20 a 50%	± 25%
10 a 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

Para o procedimento de validação devem determinar-se os tempos de retenção de cada CCD e dos padrões internos; intensidade do sinal dos analitos; intensidade do sinal do padrão interno

e intensidade do sinal de ruído de fundo na ausência de sinal nos tempos de retenção esperados para os analitos. Todos os cálculos são realizados com tempos de retenção relativos (TRR) e razões de intensidades entre os analitos e os padrões internos.

O tempo de retenção relativo (TRR) do analito (A) relativamente a um padrão interno é obtido pela aplicação da equação 1:

$$TRRA = \frac{TRA}{TRPi}$$

[eq. 1]

em que TRRA é o tempo de retenção relativo do analito A e TRPi é o tempo de retenção do padrão interno. Em relação à amplitude de sinal/ruído, as amostras que contêm o analito ou o padrão interno têm de ter uma amplitude de sinal três vezes maior do que a amostra branca, como se encontra esquematizado na figura 2.

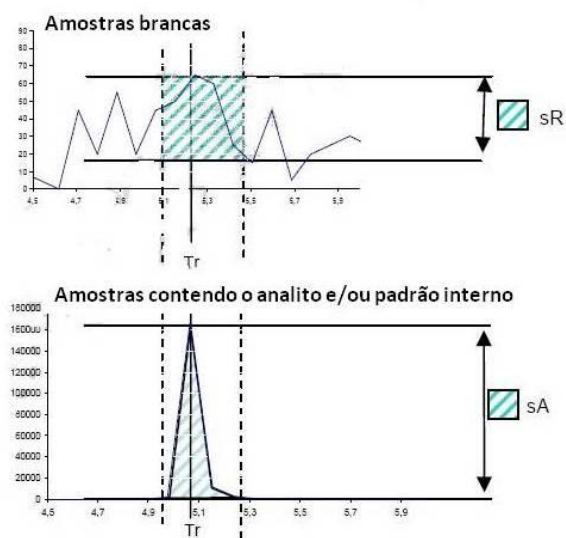


Figura 2- Forma de medição dos sinais a considerar na validação (sR corresponde à amplitude do ruído de fundo na ausência do analito e sA corresponde à amplitude/intensidade do sinal do analito). Adaptado de Manual de procedimentos técnicos PO-013-HP/BR [51].

A razão entre o tempo de retenção da substância a analisar e o do padrão interno, deve ser idêntico ao do padrão de calibração na matriz em estudo, com uma tolerância de $\pm 2,5 \%$.

3.1. Aplicabilidade e Robustez

A aplicabilidade de um método descreve o conjunto de parâmetros, constituído pela a identidade do analito e a respectiva gama de concentrações utilizada e a matriz considerada para validação. A aplicabilidade do método em relação às matrizes e espécies animais deve ser especificada na descrição da validação da metodologia analítica [52].

A robustez permite avaliar a susceptibilidade de um método analítico a alterações na metodologia analítica, sem alterar significativamente a sua exatidão e precisão, de modo a identificar quaisquer alterações que podem alterar os resultados analíticos. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando o procedimento analítico é executado.

As condições experimentais que podem estar sujeitas a variações são por exemplo, estabilidade dos reagentes, composição da amostra, pH, temperatura.

Na descrição do procedimento analítico devem identificar-se os factores que podem alterar a fiabilidade do resultado e as condições da sua aplicabilidade. Quando se estuda a especificidade do método em relação à amostra em estudo pode-se analisar a robustez.

3.2. Especificidade /selectividade

A especificidade consiste na capacidade do método desenvolvido discriminar entre as substâncias de análise e possíveis interferentes tais como componentes da matriz, produtos de degradação e isómeros. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias. Um método que dá resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado

seletivo. Para verificar as interferências, são necessários vários procedimentos [13]:

1º) devem analisar-se amostras em branco para detectar a presença de possíveis interferentes.

2º) seleccionar-se compostos quimicamente semelhantes (metabolitos, derivados, etc.) ou outras substâncias susceptíveis de estar presentes nas amostras.

3º) devem fortificar-se amostras em branco com compostos que possam interferir na identificação e/ou na quantificação do analito a analisar.

Após o procedimento analítico deve-se verificar se os compostos adicionados induzem a uma falsa identificação e/ou se estes interferem na quantificação da substância a analisar. Deve ser analisado um número representativo de amostras em branco ($n \geq 20$).

3.3.Veracidade /Recuperação

A veracidade é um dos parâmetros a determinar para avaliar a exactidão de um método, e corresponde ao grau de concordância entre um valor de referência aceite e o valor médio de uma vasta série de resultados. A veracidade é geralmente expressa como o desvio sistemático. A exactidão é definida como o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite.

Geralmente a veracidade é calculada através do uso de materiais de referência certificados, MRC, na comparação do método proposto com um método de referência ou no uso de ensaios de recuperação da matriz.

A recuperação está relacionada com a exatidão, já que mostra a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático devido a perdas de analito causadas por baixa recuperação da extração, por medidas volumétricas imprecisas ou por substâncias interferentes na amostra. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra , ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado.

A recuperação corresponde assim à percentagem da concentração real de uma substância recuperada durante a metodologia analítica, através da fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{teor medido}}{\text{nível de fortificação}} \times 100$$

[eq. 2]

No caso das metodologia aplicados neste trabalho os valores de recuperação devem ser determinados em, pelo menos, seis ensaios paralelos com fortificações correspondentes a 0.5 LMR, 1 LMR e 1.5 LMR.

Na directiva 2002 /655/CE [13] estão descritos os critérios de aceitação da recuperação para métodos analíticos (tabela 3). Os dados corrigidos com a média da recuperação só são aceitáveis se estiverem nos intervalos indicados. Recuperações acima de 100% justificam-se pelo efeito de matriz que alguns extractos podem conter em determinados tempos de retenção [53]. A veracidade mínima aplicável em métodos de análise quantitativa está estabelecida na legislação de acordo com a tabela 4 [13] e os dados corrigidos com a média da recuperação só são aceitáveis se se inserirem nos intervalos constantes na tabela 5.

Tabela 5 - Intervalo de veracidade mínima dos métodos quantitativos.

Fracção mássica	Intervalo
$\leq 1 \mu\text{g/Kg}$	-50% a +20%
$> 1 \mu\text{g/Kg}$ a $10 \mu\text{g/Kg}$	-30% a +%10
$\geq 10 \mu\text{g/Kg}$	-20% a +%10

3.4. Precisão

A precisão é outros dos parâmetros para avaliar a exactidão dos métodos. É um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas; pode assim ser definida como o coeficiente de variação interlaboratorial (CV) para análises repetidas de um MRC ou de uma matriz fortificada em condições de reprodutibilidade. Este parâmetro é calculado através da equação de Horwitz (Eq. 3), em que C é expressa sob a forma de uma potência de 10.

$$CV = 2^{(1-0.5\log C)} \quad [\text{eq. 3}]$$

A precisão engloba a variabilidade dos resultados em duas situações:

1) utilização do método em condições idênticas de repetibilidade na qual se efectuam várias análises em paralelo (pelo menos seis réplicas) para cada um dos níveis de fortificação: 0.5 LMR, LMR e 1.5 LMR.

2) reprodutibilidade intralaboratorial em que se modifica no mínimo um parâmetro ou executam-se as mesmas análises, mas em dias diferentes, num mínimo de três dias, variando operador e/ou matriz.

Os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade são descritos pelo coeficiente de variação (CV), desvio-padrão, σ , e a média dos resultados, μ .

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \quad [\text{eq. 4}]$$

Nas análises de repetibilidade, o CV intralaboratorial deve situar-se entre 1/2 e 2/3 dos valores da equação de Horwitz. Para compostos com LMR o método deve ter um valor de reprodutibilidade intralaboratorial correspondente a uma concentração de 0.5 LMR e não superior ao CV de reprodutibilidade.

3.5 Limite de decisão, $CC\alpha$:

O limite de decisão ($CC\alpha$) é um termo usado pela Comunidade Europeia e depende de se a substância (medicamento veterinário) a ser analisada na matriz (alimento) possui um LMR ou apenas um LMPR estabelecido. O limite de decisão é definido como o menor nível de concentração no qual o método pode discriminar com uma certeza estatística de $1-\alpha$ que o analito em questão está presente. Em compostos com LMR a amostra pode ter concentrações ao nível do LMR estabelecida com uma probabilidade de erro α igual a 5%. Em compostos não autorizados, esta probabilidade corresponde a uma probabilidade de erro α igual a 1%. Este parâmetro define o limite a partir do qual uma amostra pode ser declarada não conforme.

3.6.Capacidade de detecção, CC β :

Este parâmetro representa a menor concentração de composto que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro β que é igual a 5% para todos os compostos. Em compostos sem LMR, CC β corresponde à concentração mais baixa que o método é capaz de detectar com uma certeza estatística de $1 - \beta$. Em compostos com LMR, CC β corresponde à concentração a que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de $1 - \beta$.

Nos métodos de triagem, a avaliação destes parâmetros é feita com base na transição mais intensa do analito.

No caso dos métodos de confirmação para identificação inequívoca da presença do composto, o cálculo baseia-se no sinal mais crítico, ou seja na segunda transição.

4. Material e Métodos

4.1. Equipamento e material

No procedimento de extracção os equipamentos usados foram: balança Mettler PC 2000 (precisão $\pm 0.01\text{g}$); balança analítica Mettler AE 100 (precisão $\pm 0.0001\text{ g}$); agitador Vortex Scientific industries; banho de ultra-sons Elma Transsonic 660/H; agitador Reax 2 Heidolph Instruments; centrífuga Heraeus Megafuge 1,0 R; TurboVap Lifesciences, LV Caliper, e centrífuga Eppendorf 5415 D. Os extractos obtidos no processo extrativo foram filtrados através de filtros Whatman Un203Npugmf Glass Microfiber Mini-Uniprep Syringeless Filter, $0.45\text{ }\mu\text{m}$.

O sistema de LC-MS/MS usado era composto por um HPLC Agilent, modelo 1100, com bomba binária e tabuleiro de solventes, injetor automático de volume variável e forno para colunas, acoplado a um detector de massas do tipo triplo quadrupolo PE Sciex API 3000, Applied Biosystems, com fonte de ionização por electrospray positivo (ESI+) e electrospray negativo (ESI-). A aquisição de dados foi controlada pelo software Analyst da Sciex, versão 1.4.1. A separação cromatográfica foi feita utilizando uma coluna Zorbax SB – C18 ($2.1 \times 150\text{ mm}$, $3.5\mu\text{m}$), com pré-coluna Zorbax SB aq, ($2.1 \times 12.5\text{ mm}$, $5\mu\text{m}$). Os solventes foram previamente filtrados por um sistema de membrana de fluoreto de polivinilideno, PVDF, 13 mm e $0.45\text{ }\mu\text{m}$ e desgaseificados por vácuo.

4.2. Reagentes e padrões

Foi utilizado acetonitrilo de grau HPLC da J.T.Baker [filtrado ($0.2\text{ }\mu\text{m}$) e embalado sob azoto], ácido fórmico p.a. da Merck Emsure 98-100%, dimetilsufóxido Merck 99,8% e água ultra-pura do tipo I. Os padrões dos compostos lasolacida de sódio, narasina de sódio, salinomicina de sódio, monensina de sódio, maduramicina de sódio, halofuginona, robenidina, nigericina, diclaruzil, dinitrocarbanilida e diclaruzil-d8 (todos com 99% de pureza) foram adquiridos ao Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL).

4.3. Soluções

Todas as soluções foram preparadas e armazenadas recorrendo a material de vidro. As soluções foram armazenadas a uma temperatura entre 5 ± 3 °C.

4.3.1. Soluções gerais

Para a fase móvel preparou-se uma solução de ácido fórmico a 0.1% em água, diluindo 1 mL de ácido fórmico em 1000 mL de água ultra-pura do tipo I.

Para a solução acetonitrilo: água (90:10, v:v) misturou-se 90 mL de acetonitrilo com 10 mL de água ultra-pura do tipo I.

4.3.2. Soluções padrão

4.3.2.1. Preparação das soluções mãe de SLM, LSD, NIG, NRS, MSN, MDM, DCZ, RBD, DNC, HFG e DNC_d8 (1000 µg/mL).

Pesaram-se rigorosamente $10 \pm 0,5$ mg de cada composto padrão. Prepararam-se soluções mãe de SLM, LSD, NIG, NRS, MSN e MDM em balões volumétricos de 10 mL dissolvendo os compostos em acetonitrilo. Prepararam-se soluções mãe de DCZ, RBD, DNC e DNC_d8 em balões volumétricos de 10 mL dissolvendo os compostos em dimetilsulfóxido. Preparou-se uma solução mãe de HFG num balão de 10 mL dissolvendo o composto numa solução de acetonitrilo:água (50:50, v/v).

4.3.2.2. Preparação das soluções intermédias de CCDs (10 µg/mL)

Transferiu-se 100 µL de cada uma das soluções mãe de SLM, LSD, NRS, MSN, MDM, DCZ, RBD, e DNC e HFG para balões volumétricos de 10 mL e fez-se o volume com acetonitrilo.

4.3.2.3. Preparação das soluções intermédias de trabalho de CCDs (1 µg/mL)

Transferiu-se 1 mL de cada uma das soluções intermédias de SLM, LSD, NIG, NRS, MSN, MDM, DCZ, RBD, DNC e HFG para balões volumétricos de 10 mL e fez-se o volume com acetonitrilo.

4.3.2.4. Preparação de soluções de trabalho de CCDs (0.1 µg/mL)

Transferiu-se 1mL de cada uma das soluções intermédias de trabalho de LSD, HFG, NRS, SLM, MSN, MDM, RBD, DCZ e DNC a 1µg/mL para balões volumétricos de 10mL e perpez-se o volume com acetoneitrilo.

4.3.2.5. Preparação das soluções de trabalho de LMR de CCDs

Para um balão volumétrico de 10 mL transferiu-se os seguintes volumes: 60 µL de solução individual MDM a 1 µg /mL; 150 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de LSD, NRS e RBD; 15 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de SLM; 24 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de MNS; 90 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de HFG; 120 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de DCZ e 300 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de DNC. Perpez-se o volume com acetoneitrilo.

4.3.2.6. Preparação das soluções intermédias dos padrões internos, CCDs PI (10 µg/mL)]

Transferiu-se 100 µL de cada uma das soluções mãe de DNC_d8 e NIG para balões volumétricos de 10 mL e perpez-se o volume com acetoneitrilo.

4.3.2.7. Preparação da solução de trabalho dos CCDs PI (1µg/mL)]

Transferiu-se 1 mL da solução intermédia de CCDs PI para um balão volumétrico de 10 mL e perpez-se o volume com acetoneitrilo.

4.3.2.8. Preparação da mistura directa de padrões, MDP

Para um balão volumétrico de 10 mL transferiu-se os seguintes volumes: 60 µL de solução individual MDM a 1 µg /mL; 150 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de LSD, NRS e RBD; 15 µL de solução intermédia a 10 µg/mL de SLM; 24 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de MNS; 90 µL de solução intermédia a 10 µg/mL de HFG; 120 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de DCZ e 300 µL de solução intermédia a 10 µg /mL de DNC. Perpez-se o volume com acetoneitrilo.

4.4. Procedimento experimental

4.4.1. Optimização das condições experimentais do detector de massa MS/MS.

Para a determinação das condições experimentais do detetor de massa, realizou-se uma infusão directa de cada uma das soluções intermédias de CCDs e CCDs PI a 10 µg/mL em

modo de aquisição automática, tanto em ionização positiva (ESI+) como em ionização negativa (ESI-). Determinam-se assim os fragmentos iónicos percursos, em modo MS, e respectivos produtos, em modo MS/MS, bem como as condições do instrumento que proporcionam as maiores intensidades desses fragmentos.

O fragmento iónico precursor e os dois fragmentos iónicos produto mais intensos estão indicados na tabela 6, de acordo com a polaridade da fonte de ionização que se revelou mais favorável, bem como as energias de colisão (EC) mais adequadas.

Tabela 6 - Fragmentos iónicos, modo de ionização e energias de colisão mais favoráveis para cada um dos compostos.

Composto	Polaridade da fonte de ionização	ião precursor	ões produto	Energia de colisão (EC)
LSD	Positiva	613 [M+Na] ⁺	377	49
			359	49
NRS	Positiva	788 [M+Na] ⁺	431	63
			531	61
SLM	Positiva	774 [M+Na] ⁺	431	61
			265	67
MSN	Positiva	693 [M+Na] ⁺	461	67
			479	67
MDM	Positiva	940 [M+Na] ⁺	878	33
			719	89
HFG	Positiva	416 [M+H] ⁺	100	35
			120	31
RBD	Positiva	334 [M+H] ⁺	155	34
			138	30
NIG (PI)	Positiva	747 [M+Na] ⁺	747	61
DCZ	Negativa	407 [M+H] ⁺	336	-24
			334	-22
DNC	Negativa	301 [M+H] ⁺	137	-16
			107	-42
DNC_d8 (PI)	Negativa	309 [M+H] ⁺	141	-30

Tendo em conta os iões percursos e produto obtidos e otimizados para cada composto, e dado que o procedimento analítico instrumental decorre em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring), utilizaram-se os pares ião precursor>ião produto indicados na tabela 9 como as transições a monitorizar na deteção e quantificação dos compostos.

Numa segunda fase, e uma vez definidas as condições de operação para o espectrómetro de massa, foi avaliado o comportamento dos compostos na fonte de ionização. Esta optimização foi feita manualmente, por infusão directa de cada uma das soluções intermédias de CCDs e CCDs PI a 10 µg/mL, fazendo variar as condições de temperatura da fonte, gás de cortina, gás nebulizador (GAS 1) e gás de solvatação (GAS 2). A solução de compromisso mais favorável alcançada está indicada na tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros optimizados da fonte de ionização

Gás de nebulização, solvatação, cortina e de colisão	Azoto
Ionização	Electrospray
Temperatura da fonte (°C)	500°C
Fluxo do gás nebulizador (L/h)	10
Fluxo do gás de solvatação (L/h)	800
Fluxo do gás de cortina (L/h)	10
Fluxo do gás de colisão (mL/h)	0.20

4.4.2. Condições cromatográficas

Foi avaliada a ordem de eluição dos compostos tendo como principal objectivo obter um tempo de corrida o mais curto possível. Com este objectivo, foi injetado um volume de 50µL da solução MDP, em modo MRM (Multiple Reaction Monitoring). As condições cromatográficas optimizadas para a realização desta avaliação encontram-se descritas nas tabelas 8 e 9 e 10.

Tabela 8 - Condições cromatográficas

Pré-coluna cromatográfica	Zorbax SB aq, (2.1 x 12.5 mm, 5µm).
Coluna cromatográfica	Zorbax SB – C18 (2.1x150 mm, 3.5µm)
Fase móvel	A: Acido fórmico a 0,1% B: Acetonitrilo
Fluxo	500 µL/min
Temperatura da coluna	40°C
Volume de injeção	20 µL

Mediante a análise dos resultados foi definida a ordem de eluição dos compostos e respetivos tempos de retenção e tempos de retenção relativos (TR e TRR), que estão indicados na tabela 14.

Tabela 9 - Gradiente da fase móvel para detecção por MS com ionização em modo positivo (ESI+)

T (min)	% A	% B
2,0	100	0
12,0	0	100
19,0	100	0

Tabela 10 - Gradiente da fase móvel para detecção por MS com ionização em modo negativo (ESI-)

T (min)	% A	% B
1,5	100	0
12,0	0	100
22,0	100	0

Tabela 11- Tempos de retenção e tempos de retenção relativos dos CCDs

Composto	Modo de ionização	TR	TRR
LSD	Positivo	12,49	0,916
NRS	Positivo	13,22	0,971
SLM	Positivo	12,86	0,944
MSN	Positivo	12,57	0,923
MDM	Positivo	13,36	0,981
HFG	Positivo	7,07	0,565
RBD	Positivo	9,01	0,662
NIG (PI)	Positivo	13,61	----
DCZ	Negativo	8,67	1,017
DNC	Negativo	8,56	1,005
DNC_d8 (PI)	Negativo	8,52	----

Com as condições indicadas nas tabelas de 8 a 11, foi construído, no *software* do equipamento, o método de aquisição em MRM utilizado nas determinações analíticas efetuadas neste trabalho.

4.4.3. Extração

As amostras de fígado usadas no desenvolvimento e validação da metodologia analítica incluíram amostras de aves, de bovino e de suíno que foram adquiridas no mercado.

No desenvolvimento do procedimento extractivo, foram utilizadas amostras de fígado que foram fortificadas com os diversos CCDs. De uma forma genérica, esta fortificação foi feita de forma a se obter uma concentração, na amostra, igual ao LMR que está estabelecido para frangos (tabela 12). Esta escolha deve-se a que estes limites são os mais baixos entre as espécies para as quais estão estabelecidos LMR, permitindo aferir o processo de extração e de detecção para os limites mínimos de concentração toleráveis.

Foram utilizadas as condições instrumentais do LC-MS/MS anteriormente indicadas. Pela análise dos extractos, foi verificada a adequação destas condições optimizadas com soluções padrão, na matriz biológica em estudo.

Tabela 12 - Limite máximo de resíduos para os CCDs em fígado de frango

Compostos	Espécie	LMR (µg/Kg)	Matriz
LSD	Frangos	50	Fígado
NRS		50	
SLM		5	
MSN		8	
MDM		2	
RBD		50	
HFG		30	
DNC		300	
DCZ		1500	

O procedimento extractivo resultante foi o seguinte: pesou-se, para um tubo de centrifuga, 3 ± 0.05 g de amostra de fígado previamente triturada e homogeneizada. Adicionaram-se 60 μ L da solução de trabalho (1 μ g/mL), dos padrões internos DNC_d8 e NIG. A amostra foi agitada no vortex durante 5 minutos e deixou-se em repouso durante 10 minutos. Adicionaram-se 10 mL de acetonitrilo, e após agitação no vortex durante 2 minutos, colocou-se sob ultra-sons durante 5 minutos.

Agitou-se, de seguida, no agitador reax durante 10 minutos e centrifugou-se 10 minutos a 3000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo e evaporou-se o extracto à secua no TurboVap, a 45°C sob corrente de N₂.

O resíduo seco foi redissolvido com 600 μ L de solução de acetonitrilo/água (90:10), colocado no ultra-sons durante 5 minutos e agitado no vortex durante mais 2 minutos. Centrifugou-se a 13000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtros mini-uniprep e analisado por LC-MS/MS.

4.5. Validação

O desempenho do método para a detecção e quantificação dos CCDs foi estudado com os critérios de validação da Decisão da Comissão 2002/657/CE [13] descritos em 2.

Para a realização do processo de validação, foram utilizadas amostras de fígado brancas. Para isso, foi verificado se, em cada uma das amostras de fígado disponíveis, existiam sinais da presença dos compostos a analisar ou de interferentes que pudessem pôr em causa a identificação e/ou quantificação dos analitos.

Assim, as amostras foram extraídas com o procedimento de extração desenvolvido, e analisadas por LC-MS/MS nas condições instrumentais testadas.

As amostras que não apresentaram interferentes ou eventualmente CCDs, foram consideradas amostras brancas (ABR). Destas, seleccionaram-se 20 amostras, designadamente 10 de aves, 5 de bovino e 5 de suíno, para serem utilizadas no processo de validação. Esta selecção privilegiou as amostras com menor ruído de fundo. Estas amostras foram subdivididas num número de alíquotas considerado suficiente para se realizar todo o processo de validação.

Realizaram-se 3 rectas de calibração, uma em cada dia, em três dias consecutivos, variando o operador (pessoas do mesmo laboratório que colaboraram no estudo).

Para o efeito fortificaram-se ABRs nas concentrações de 0 LMR, 0,5 LMR, 1 LMR, 1,5 LMR, 2 LMR e 3 LMR, de acordo com a tabela 16. As amostras fortificadas foram designadas por ABF.

Cada uma das rectas de calibração foi construída com uma amostra para cada uma das concentrações de 0, 2 e 3 LMR, e seis amostras para cada uma das concentrações de 0,5, 1 e 1,5 LMR.

Para o efeito, o LMR escolhido para efectuar o procedimento de validação foi o estabelecido para a espécie frango pela razão já explicitada (tabela 13).

Tabela 13 - Volume da solução de trabalho de LMR de CCDs e dos PI adicionados em função da concentração pretendida

Concentrações LMR (µg/Kg)	Volume da solução de trabalho de LMR de CCDs (mL)	Volume das soluções de PI (mL)
0	0	0,060
0,5	0,5	0,060
1	1	0,060
1,5	1,5	0,060
2	2	0,060
3	3	0,060

Para o procedimento de validação determinaram-se: os tempos de retenção de cada CCD e dos padrões internos; intensidade do sinal do ruído de fundo na ausência de sinal; intensidade do sinal dos analitos e do padrão interno. Todos os cálculos foram feitos com tempos de retenção relativos (TRR) e razões de intensidades entre os analitos e os padrões internos.

Cada uma das rectas de calibração foram acompanhadas da injeção de mistura directa de padrões, (MDP).

A ordem de injeção no sistema LC-MS/MS foi a seguinte: MPD, ABR (concentração 0 dos analitos), ABF, ABR (concentração 0 dos analitos) e MPD.

4.5.1. Selectividade, Especificidade e Aplicabilidade

Para o estudo da selectividade, especificidade e aplicabilidade analisaram-se as 20 ABR seleccionadas de aves, bovino e suíno.

4.5.2. Estudo da Veracidade/Recuperação

Para a determinação da veracidade e recuperação e devido a não haver disponível material de referência certificado, utilizaram-se os dados obtidos com as 3 rectas de calibração. Analisaram-se as amostras pela metodologia a validar e calculou-se a concentração final para cada amostra. Calculou-se a recuperação, sendo esta a razão entre o resultado da concentração medida e a concentração de fortificação (em percentagem) de acordo com a equação 2 verificando se os valores dos diversos CCDs se encontravam dentro dos valores aceitáveis (tabela 4).

4.5.3. Estudo da Precisão

Para a determinação da precisão do método determinou-se a repetibilidade e a reprodutibilidade utilizando-se os dados obtidos com as 3 rectas de calibração. Os valores de repetibilidade e de reprodutibilidade foram comparados com os valores aceitáveis, de acordo com a equação de Horwitz (equação 6). Calculou-se também, para as concentrações de 0,5, 1 e 1,5 LMR a concentração média obtida, o desvio-padrão e coeficiente de variação, (CV).

4.5.4. Estudo $CC\alpha$ e $CC\beta$

Para o cálculo de $CC\alpha$ e $CC\beta$ analisaram-se as 20 ABR seleccionadas de aves, bovino e suíno fortificadas ao nível do LMR estabelecido para frangos (tabela 15). O limite de decisão ($\alpha = 5\%$) é igual à concentração do valor do LMR mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão.

A capacidade de detecção ($\beta = 5\%$) é igual ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão.

A tabela 14 sumariza as análises realizadas para os diversos estudos de validação

Tabela 14- Análises efectuadas para os diversos estudos de validação

Análises (nº)	Designação	Concentrações ao nível do LMR (µg/Kg)	Ensaio a validar
20	ABR		Aplicabilidade
63	ABF	0, 0,5, 1 e 1,5, 2 e 3	Rectas de Calibração/ Robustez
54	ABF	0,5, 1 e 1,5	Recuperação/ Repetibilidade e Reprodutibilidade
20	ABF	1	$CC\alpha$ e $CC\beta$

5. Apresentação e Discussão dos Resultados

O objectivo deste estudo foi, como referido anteriormente, detectar e quantificar 9 coccidiostáticos (CCDs) em simultâneo em amostras de fígado de origem animal, com recurso à técnica LC/MS/MS.

Os parâmetros da separação cromatográfica foram estabelecidos de modo a obter condições cromatográficas que permitissem a identificação e quantificação dos CCDs em tempo útil em análises de trabalho de rotina.

Uma vez que os CCDs são compostos maioritariamente hidrofílicos, utilizou-se como fase móvel um gradiente de ácido fórmico a 0.1% e acetonitrilo e como fase estacionária uma coluna cromatográfica, Zorbax SB-aq (*StableBond aqueous*), que retém os compostos hidrofílicos evitando o colapso da fase estacionária, num intervalo de pH entre 1 e 8 [54]. Neste procedimento, esta coluna demonstrou ser robusta. Com este par fase estacionária/fase móvel foi possível a análise dos CCDs com uma resolução adequada ao objectivo em vista e tempos de retenção curtos.

Na detecção foi utilizado um detector de espectrometria de massa do tipo triplo quadrupolo, recorrendo a uma fonte de ionização à pressão atmosférica do tipo *electrospray* assistido por nebulização. A energia seleccionada em modo positivo ou em modo negativo foi a que produziu fragmentações dos iões iónicos precursores com maior intensidade. Deste modo, para os analitos HFG, RBD, LSD, MSN, SLM, NRS, MDM e NIG a energia aplicada foi em modo ESI (+) e para os analitos DNC, DCZ e DNC-d8 a energia aplicada foi em modo ESI (-).

Os parâmetros instrumentais óptimos no modo MRM foram estabelecidos por infusão directa na fonte de ionização de 50 µL da solução padrão MPD, com concentrações ao nível do LMR. Utilizando as condições cromatográficas descritas e as energias de colisão aplicadas em modo ESI (+) e ESI (-) obtiveram-se os fragmentos iónicos precursores e os iões produto. Um ião precursor e dois iões produtos de transição foram determinados e monitorizados para cada CCD, e a confirmação dos analitos foi feita através da relação massa/carga dos seus fragmentos m/z, após a quebra molecular do ião precursor seleccionado. As transições iónicas escolhidas para a identificação foram os dois fragmentos mais intensos obtidos nas condições experimentais. O ião produto de maior intensidade permitiu qualificar os compostos, enquanto que o ião produto de menor permitiu a confirmação inequívoca dos CCDs.

Assim, dando como exemplo a narasina obteve-se um espectro em LC-MS onde o pico mais intenso corresponde ao ião precursor com m/z 788 (figura 3). Em LC-MS/MS obtiveram-se as transições iônicas correspondentes ao pico m/z de 431 correspondente ao ião fragmento mais intenso (fragmento qualificador) e o pico m/z de 531 correspondente ao ião fragmento menos intenso (fragmento confirmatório) (figura 4).

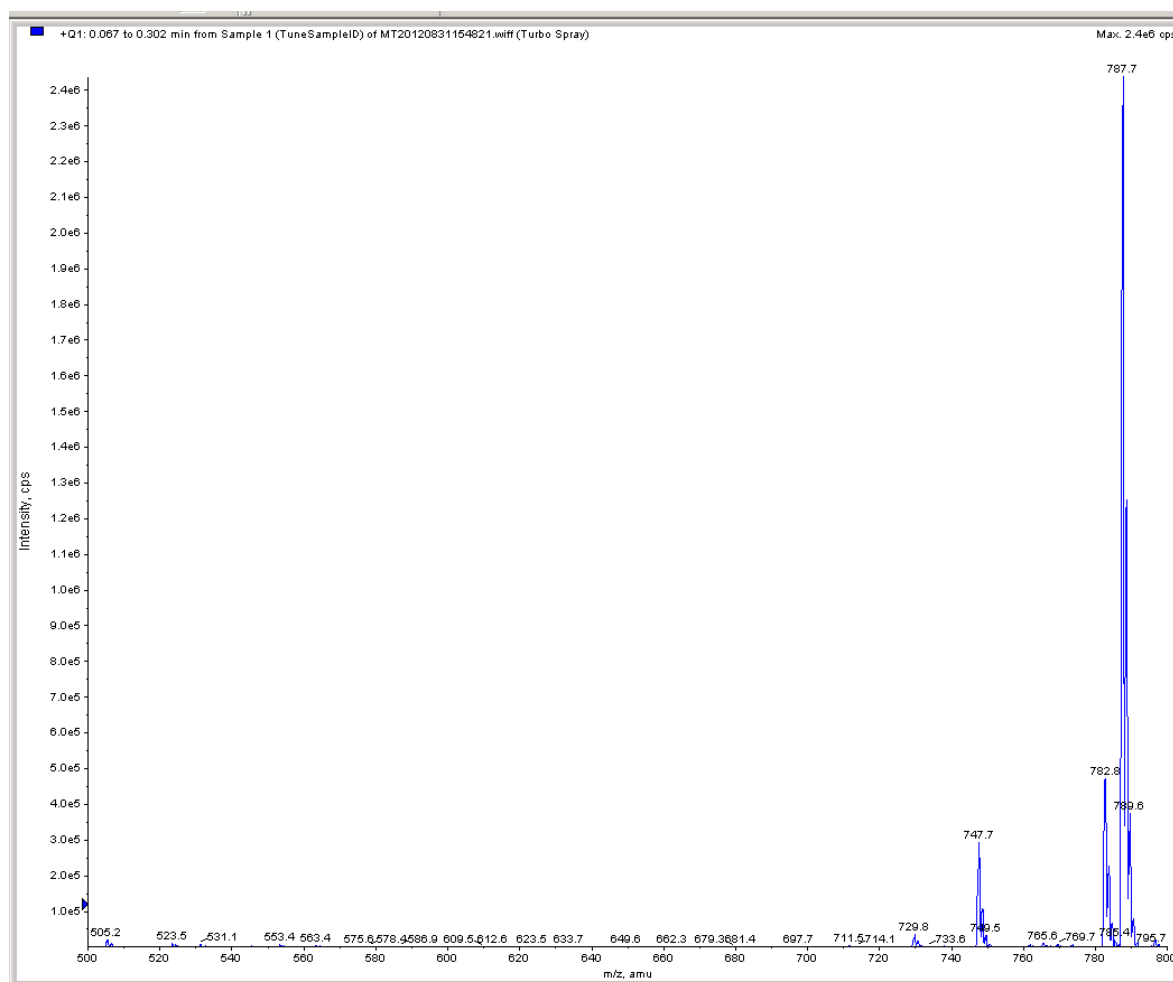


Figura 3- Espectro de massa obtido em LC-MS para o composto NRS

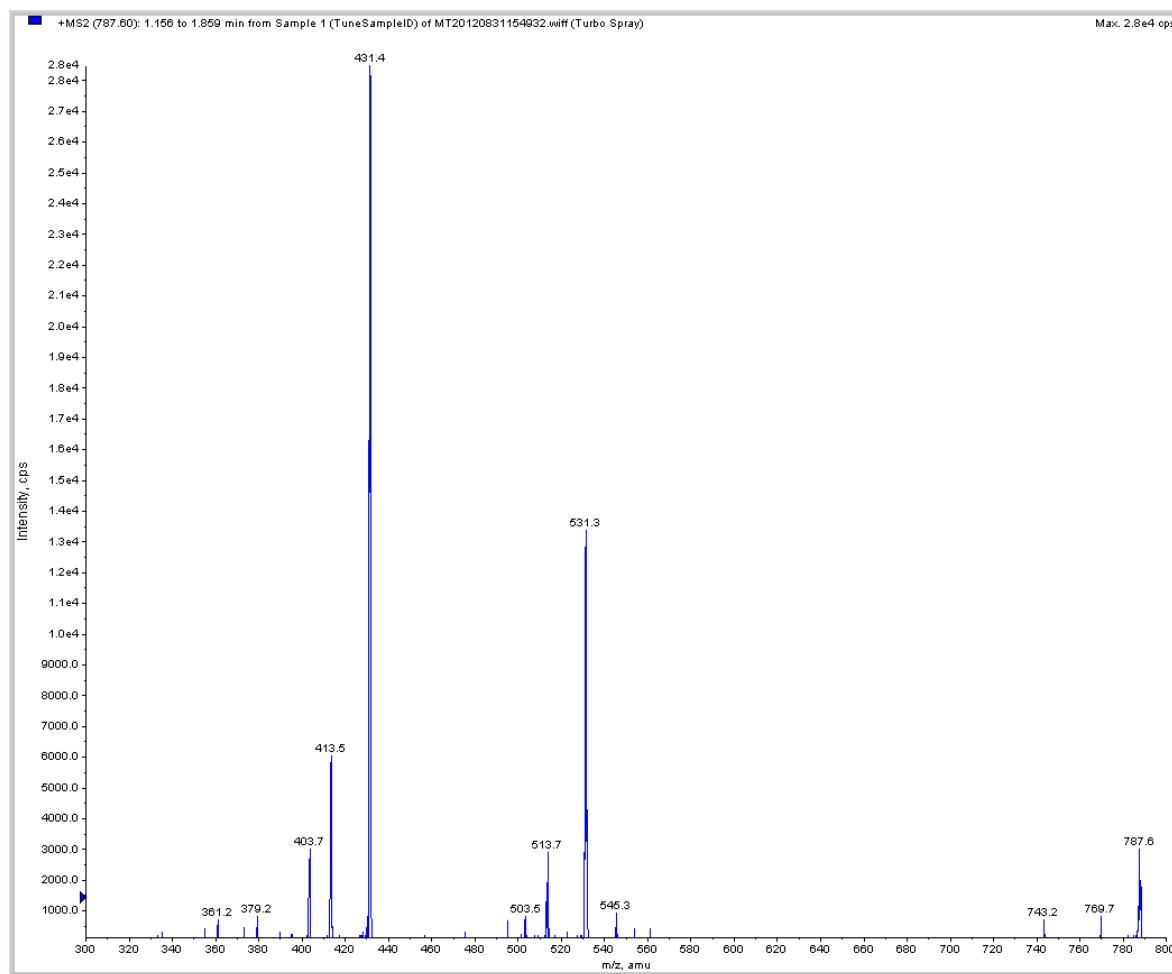
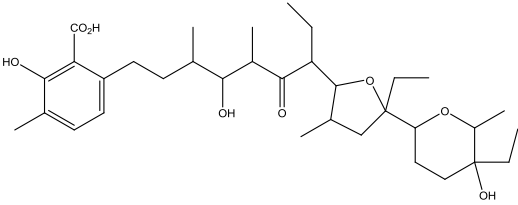
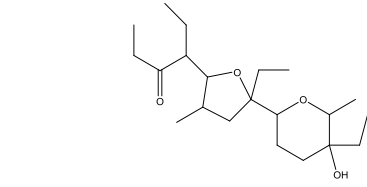
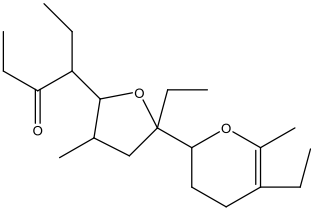
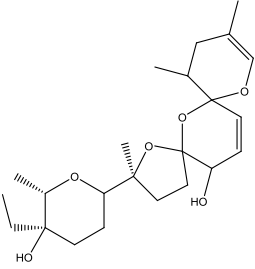


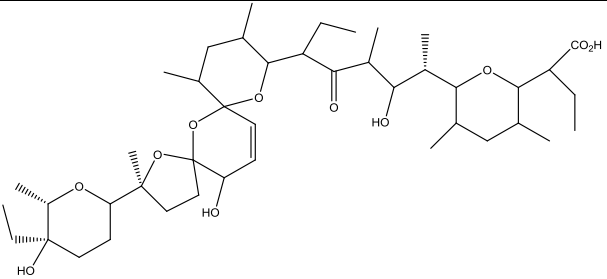
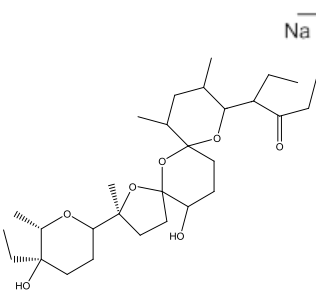
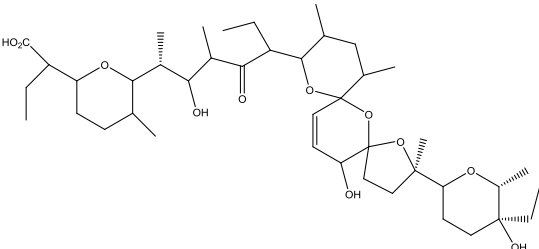
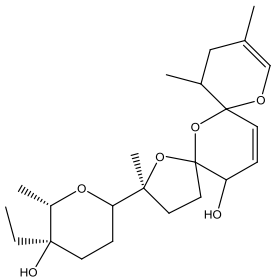
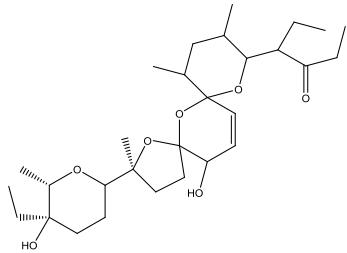
Figura 4- Espectro de massa obtido em LC-MS/MS para o composto NRS

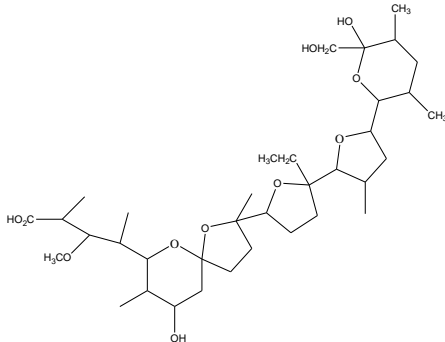
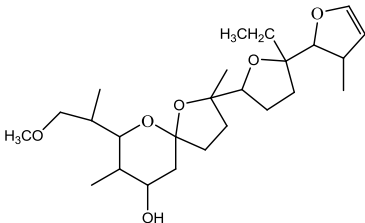
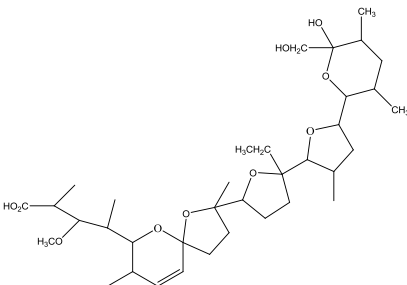
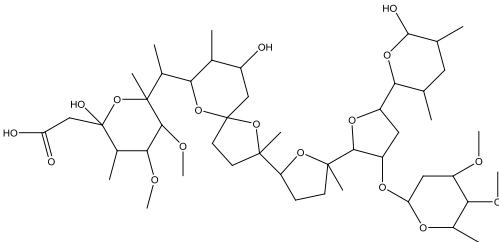
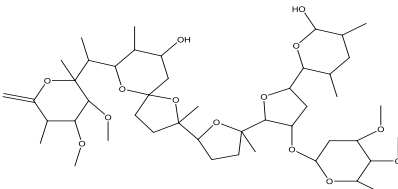
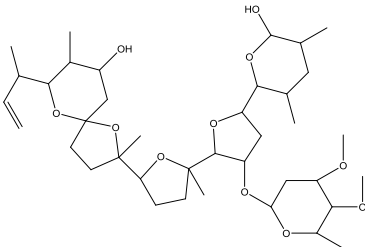
Com a mistura MPD determinaram-se também os tempos de retenção de cada CCD e dos padrões internos, a intensidade do sinal do ruído de fundo na ausência de sinal e a intensidade do sinal dos analitos e do padrão interno.

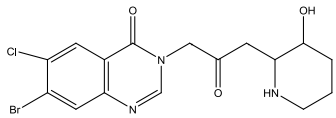
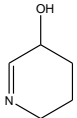
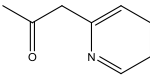
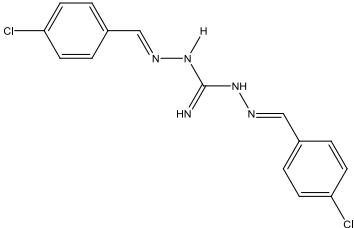
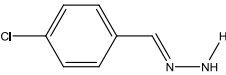
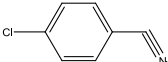
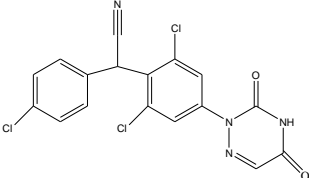
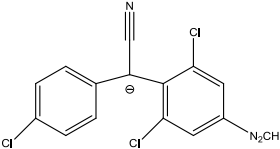
Como se pode verificar na tabela 11 do material e métodos, alguns CCDs coeluem apresentando tempos de retenção muito próximos. No entanto, as diferenças dos picos correspondentes ao ião precursor e às transições iônicas (tabela 15) permitem a identificação individual de cada composto diferenciado. A tabela 15 sumariza a informação obtida nas fragmentações m/z para os CCDS.

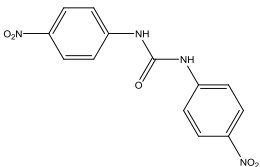
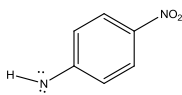
Tabela 6 - Fragmentações obtidas m/z para os CCDS

Composto	lão percurso r (m/z)	lão fragmento	m/z
<p>LSD-Na</p> 	<p>614 [M+Na]⁺</p>		<p>Na⁺</p> <p>377</p> 
			<p>Na⁺</p> <p>359</p> 
<p>NRS-Na</p>	<p>788 [M+Na]⁺</p>	<p>431</p>	<p>Na⁺</p> 

		532	 Na^+
<p>SLM-Na</p> 	<p>774 [M+Na]⁺</p>	431	 Na^+
		532	 Na^+

<p>MSN-Na</p> 	<p>693 [M+Na]⁺</p>	<p>461</p>	<p>Na⁺</p> 
		<p>676</p>	<p>Na⁺</p> 
<p>MDM-Na</p> 	<p>940 [M+Na]⁺</p>	<p>878</p>	<p>Na⁺</p> 
		<p>719</p>	<p>Na⁺</p> 

<p>HFG</p> 	<p>416 [M+H]⁺</p>	100	 H^+
		138	 H^+
<p>RBD</p> 	<p>334 [M+H]⁺</p>	155	 H^+
		138	 H^+
<p>DCZ</p> 	<p>407 [M+2-H]⁻</p>	<p>[M+2-H- C₂O₂NH]⁻ 336</p>	

<p>DNC</p> 	<p>301 [M-H]⁻</p>	137	
		107	[M-H-C ₇ H ₄ O ₃ N ₂ -NO]

As amostras de fígado usadas para todo o procedimento experimental só poderiam ser consideradas brancas se estivessem isentas de sinais cromatográficos idênticos aos dos analitos em questão. De modo a verificar se as amostras poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento do método, realizou-se todo o procedimento de extracção em estudo e analisaram-se os extractos em LC-MS/MS, nas condições experimentais obtidas para os padrões dos CCDs. Verificou-se que as amostras consideradas brancas, ABR, estavam isentas de transições iónicas monitorizadas para cada CCD em estudo.

Para o desenvolvimento da metodologia fortificaram-se as amostras consideradas brancas ABR, com os 9 CCDs nas concentrações do respectivo LMR e com os padrões internos, de modo a determinar se os resultados obtidos tinham uma amplitude de razão sinal/ruído 3 vezes superior aos da amostra branca.

A nível cromatográfico a análise com padrão interno permite verificar a eficiência da extracção e obter uma quantificação mais exacta através do tempo de retenção relativo do composto a analisar em função do PI [54]. Neste trabalho usou-se a NIG como PI em modo ESI (+) pois este composto apresenta uma semelhança estrutural com os compostos em estudo. Usou-se DNC_d8 como PI, no modo ESI (-) pois este é o composto DNC marcada isotopicamente.

Nas figuras 5 e 6 estão representados, respectivamente, os cromatogramas das transições iónicas mais intensas dos extractos das amostras fortificadas com HFG, RBD, LSD, MNS, SLM, NRS, MDM e NIG (PI), obtidos em modo ESI (+) e com os compostos DNC, DCZ e DNC_d8 (PI) obtidos em modo ESI (-).

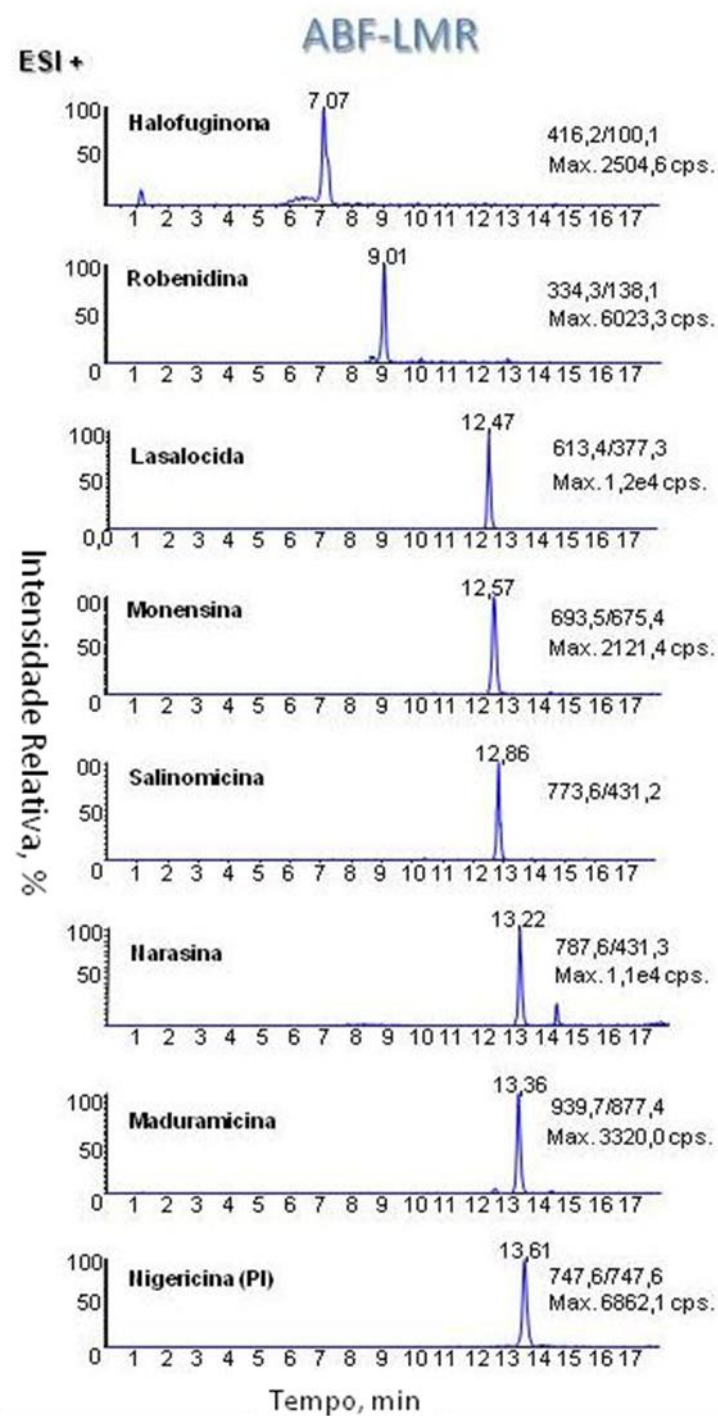


Figura 3- Cromatogramas das transições iônicas monitorizadas em modo ESI (+) dos compostos HFG, RBD, LSD, MSN, SLM, NRS, MDM e NIG (PI).

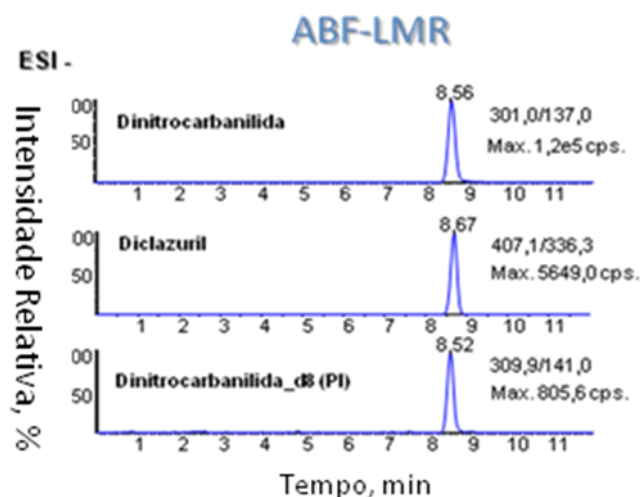


Figura 4- Cromatogramas das transições iónicas monitorizadas em modo ESI (-) dos compostos DNC, DCZ e DNC-d8 (PI).

Com a fortificação verificou-se que os resultados obtidos tinham uma amplitude de razão sinal/ruído 3 vezes superior aos da amostra branca.

5.1. Critérios de Validação

O desempenho do método para a detecção e quantificação dos CCDs estudados, como já referido previamente, foi estudado com os critérios de validação da Decisão da Comissão 2002/657/CE descritos em 2 [13].

Na determinação das características do desempenho para minimizar o número de análises combinaram-se experiências como a análise das amostras em branco com a selectividade e a aplicabilidade, a repetibilidade com a reprodutibilidade intralaboratorial e a recuperação e o limite de decisão com a capacidade de detecção.

Pelo facto de se estarem a analisar 9 CCDs, a apresentação dos resultados detalhados de todos eles faria desta dissertação um documento muito extenso. Deste modo, optou-se pela apresentação dos resultados representativos obtidos para a narasina e dos resultados finais que se obtiveram para todos os CCDs estudados.

5.1.1. Selectividade, Especificidade e Aplicabilidade

As análises a 20 amostras brancas de diferentes espécies (aves, bovinos, suínos) comprovaram a seletividade do método, uma vez que os cromatogramas em modo MRM não apresentaram detecção de analitos, ou de interferentes da matriz. A comparação entre os cromatogramas das amostras fortificadas e os cromatogramas obtidos nas análises do branco da matriz, demonstrou que nenhum ião precursor ou ião produto dos 9 CCDs em estudo foi detectado nas amostras.

5.1.2. Traçado das curvas de calibração

A linearidade, faixa de trabalho e a aplicabilidade do método foram verificadas através das curvas analíticas (curvas de calibração), determinadas a partir da análise da matriz fortificada com os analitos em concentrações na faixa do LMR definido para cada CCD.

Realizaram-se 3 rectas de calibração, para cada CCD, de modo a permitir a quantificação das amostras fortificadas e para determinar a robustez do método em relação ao operador. As concentrações para a realização das rectas de calibração foram efectuadas em matrizes fortificadas com cada CCD nas concentrações de 0,5, 1, 1,5, 2 e 3 LMR de forma intercalada entre 3 dias diferentes e com operadores diferentes.

Como exemplo, a NRS tem como LMR 50 µg/Kg pelo que se fortificaram amostras com 25, 50, 75, 100 e 150 µg/Kg e com o padrão interno NIG, com concentração de 20 µg/Kg. A determinação foi realizada a partir da área do pico da transição iónica mais intensa, calculando a área relativa a partir da razão entre a área do padrão e a do padrão interno (tabelas 16 a 18).

Tabela 16 - Intensidade de área obtida para a NRS no dia 1 nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 150 µg/Kg

	Concentração de NRS (µg/kg)	Intensidade da área NRS no dia 1						MÉDIA Y
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	
	0,000	0,0902						0,090
	25,000	17,606	18,243	10,642	16,780	18,681	17,399	16,558
	50,000	48,456	41,555	43,622	37,263	32,830	46,462	41,698
	75,000	46,565	48,943	58,392	71,509	70,162	51,973	57,924
	100,000	67,553						67,553
	150,000	141,599						141,599
MÉDIA X COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DECLIVE	66,667							
	0,9801							
	0,9013							

ORDENADA NA ORIGEM	-5,8473
--------------------	---------

Tabela 17 - Intensidade de área obtida para a NRS no dia 2 nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 150 µg/Kg

Concentração de NRS (µg/kg)	Intensidade da área NRS no dia 2						MÉDIA Y
	A1'	A2'	A3'	A4'	A5'	A6'	
0,000	0,6463						0,646
25,000	22,754	21,547	22,604	23,185	24,308	22,216	22,769
50,000	62,552	64,525	66,079	57,958	58,179	60,704	61,666
75,000	88,479	95,810	63,602	87,278	95,290	82,325	85,464
100,000	126,873						126,873
150,000	149,545						149,545
COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO	0,9831						
DECLIVE ORDENADA NA ORIGEM	1,0549						
	4,1679						

Tabela 18 - Intensidade de área obtida para a NRS no dia 3 nas concentrações 25, 50, 75, 100 e 150 µg/Kg

Concentração de NRS (µg/kg)	Intensidade da área NRS no dia 3						MÉDIA Y
	A1''	A2''	A3''	A4''	A5''	A6''	
0,000	0,0903						0,090
25,000	16,605	17,261	18,809	17,859	17,973	17,918	17,738
50,000	35,437	40,496	38,194	39,281	40,801	52,381	41,098
75,000	61,618	43,516	52,739	56,422	53,012	54,291	53,600
100,000	72,268						72,268
150,000	133,561						133,561
COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO	0,9892						
DECLIVE ORDENADA NA ORIGEM	0,8610						
	-4,3380						

Na figura 7 está representado o gráfico correspondente a uma recta de calibração para o composto NRS. No respectivo gráfico no eixo das ordenadas está representada a razão das

áreas entre a NRS e a NIG e no eixo das abcissas está representada a concentração de NRS. A recta de calibração foi realizada com a média das intensidades das áreas obtidas em cada dia.

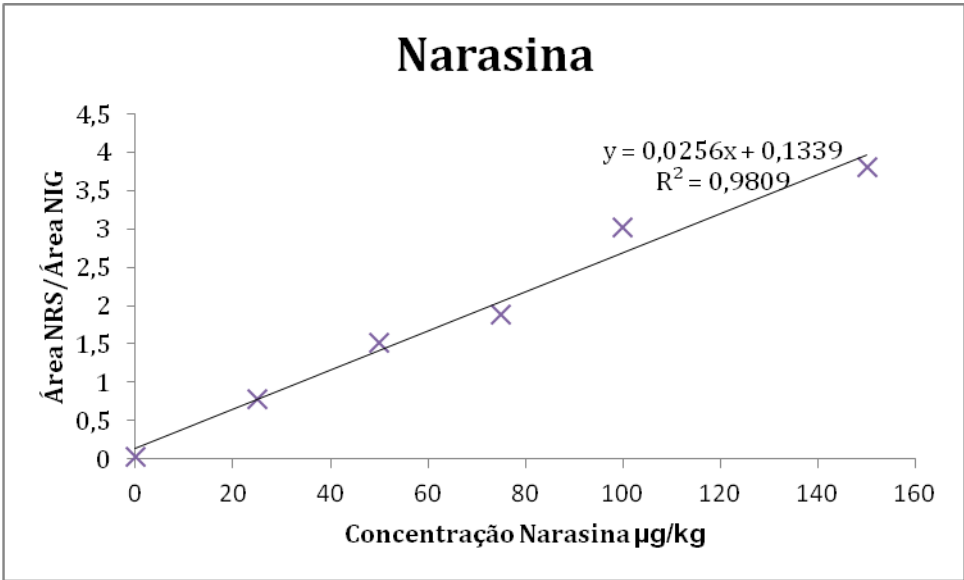


Figura 5- Recta de calibração do composto narasina, com a razão das áreas no eixo das ordenadas (y) e a concentração de narasina no eixo das abcissas (x).

As curvas de calibração e o coeficiente de determinação obtidos para os diversos CCDs estão apresentadas na tabela 19.

Tabela 7- Equações e coeficiente de determinação de análises efectuadas em 3 dias para os compostos DCZ, RBD, HFG, LSD, MDM, MSN, NRS, DNC e SLM.

Composto	Dia	Rectas de calibração	Coeficiente de determinação
DCZ	1	Y= 0,1420x - 0,3634	0,9867
	2	Y= 0,1405x - 0,3490	0,9929
	3	Y= 0,1402x - 0,4346	0,9968
RBD	1	Y= 0,2942x - 0,3718	0,9874
	2	Y= 0,2821x + 1,2344	0,9839
	3	Y= 0,3129x - 1,1308	0,9861

HFG	1	$Y = 0,0889x - 0,5157$	0,9737
	2	$Y = 0,0823x + 0,0257$	0,9961
	3	$Y = 0,0773x - 0,1429$	0,9966
LSD	1	$Y = 2,6702x + 1,6342$	0,9928
	2	$Y = 2,6806x + 1,98877$	0,9864
	3	$Y = 2,9069x + 1,6292$	0,9888
MDM	1	$Y = 0,0195x - 0,0023$	0,9900
	2	$Y = 0,0200x - 0,0067$	0,9820
	3	$Y = 0,0202x - 0,0102$	0,9564
MSN	1	$Y = 2,8224x + 5,4146$	0,9881
	2	$Y = 3,2095x + 3,9823$	0,9965
	3	$Y = 2,9862x + 6,0975$	0,9878
NRS	1	$Y = 0,0256x - 0,1339$	0,9809
	2	$Y = 0,0549x - 0,1679$	0,9831
	3	$Y = 0,08610x - 0,3380$	0,9892
DNC	1	$Y = 0,1203x - 1,7022$	0,9948
	2	$Y = 0,1224x - 1,9069$	0,9940
	3	$Y = 0,1324x - 2,1667$	0,9942
SLM	1	$Y = 1,4241x + 0,0189$	0,9903
	2	$Y = 1,4442x + 0,4602$	0,9824
	3	$Y = 1,4483x - 0,4529$	0,9963

Em relação à linearidade o laboratório estabeleceu como critério de aceitação das curvas que estas tivessem um coeficiente de determinação de 0,98, estando os CCDs estudados dentro das condições estabelecidas. Todas as curvas apresentaram coeficiente de determinação e declive semelhante entre si.

O método demonstrou ser robusto quanto ao operador que executa a análise pois a realização das curvas de calibração em dias diferentes e por operadores diferentes não afectaram o desempenho do método.

5.1.3. Recuperação

Tal como já foi referido, não foi possível determinar a veracidade do método, uma vez que não estavam disponíveis MRC. Assim, procedeu-se ao cálculo da recuperação do método com amostras fortificadas, contendo todos os CCDs em três níveis de concentração, (0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR), com seis réplicas por nível e três medidas por cada réplica. Os valores foram obtidos através das curvas de calibração. Pela aplicação da equação 4, determinou-se a recuperação para a média dos resultados. A limitação deste procedimento assenta no facto do analito adicionado não estar necessariamente na mesma forma em que se apresenta na amostra, o que pode interferir na recuperação efectuada.

Os valores obtidos para a NRS estão apresentados na tabela 20. Como se pode verificar obtiveram-se 18 resultados para cada concentração (25, 50 e 75 µg/kg) pois analisaram-se 6 réplicas para cada concentração e obtiveram-se 3 resultados para cada réplica.

A tabela 21 apresenta os resultados obtidos para o cálculo da recuperação.

Tabela 20- Resultados obtidos para amostras fortificadas com NRS a 0,5, 1 e 1,5 LMR

0,5 LMR 25 (µg/Kg)	1 LMR 50 (µg/Kg)	1,5 LMR 75 (µg/Kg)
concentração obtida (µg/Kg)	concentração obtida (µg/Kg)	concentração obtida (µg/Kg)
26,02256	60,25214	58,15440
26,72967	52,59484	60,79305
18,29549	54,88819	71,27689
25,10664	47,83253	85,83044
27,21511	42,91445	84,33604
25,79252	58,04007	64,15409
17,61875	55,34645	79,92400
16,47495	57,21602	86,87366
17,47664	58,68912	56,34131
18,02773	50,99141	78,78529
19,09248	51,20101	86,38081
17,10929	53,59416	74,09013
24,32566	46,19840	76,60810
25,08700	52,07509	55,58225
26,88509	49,40140	66,29473
25,78148	50,66298	70,57277
25,91457	52,42866	66,61253
25,85043	65,87917	68,09735

Tabela 21- Resultados da recuperação para o composto NRS

Nível fortificação (µg/Kg)	Concentração média (µg/Kg)	Recuperação (%)	Rec. do método (%)
---	---	----------------------------	-------------------------------

25,00	22,71	90,85	97,71
50,00	53,34	106,69	
75,00	71,71	95,61	

A percentagem de recuperação indicada corresponde à média dos ensaios realizados.

De acordo com a tabela 5, os compostos com LMR (fracção mássica) superior a 1 µg/kg e inferior a 10 µg/kg têm um intervalo de aceitação entre -30% e +10%, ou seja, um intervalo de aceitação para a recuperação entre 70 e 110%. Os compostos com este intervalo são a SLM e MSN.

Os compostos com LMR (fracção mássica) superior a 10 µg/kg têm um intervalo de aceitação entre -80% e +10%, ou seja, um intervalo de aceitação para a recuperação entre 80 a 110%. Os compostos com este intervalo são DCZ, RBD, HFG, LSD, MDM, NRS e DNC.

A título de exemplo, a NRS tem o LMR de 50 µg/Kg, ou seja, tem uma fracção mássica ≥ 10 µg/Kg, sendo o intervalo de aceitação entre -20% a + 10%, isto é, entre 80% e 110%.

Tabela 22- Resultados de percentagem de recuperação e critério máximo permitido para os compostos DCZ, RBD, HFG, LSD, MDM, MSN, NRS, DNC e SLM.

Composto	Recuperação (%)	Critério máximo [13]
DCZ	93,2	80-110 %
RBD	92,65	80-110 %
HFG	95,81	80-110 %
LSD	101,93	80-110 %
MDM	90,73	80-110 %
MSN	101,77	70-110%
NRS	97,71	80-110 %
DNC	91,99	80-110 %
SLM	92,76	70-110%

Como se pode observar pelos resultados apresentados na tabela 22 todos os compostos obtiveram recuperações dentro dos critérios máximos estipulados para todos os CCDs estudados, demonstrando a eficiência do método, nomeadamente do processo de extracção usando acetonitrilo como solvente, como descrito por Moloney *et al* [39]. Os valores de recuperação obtidos foram superiores aos de Anna Martínez-Villalba *et al.* cujo método teve melhor separação cromatográfica entre os compostos [43]. Recuperações com valores superiores a 100% justificam-se pelo efeito de matriz, pois esta pode ter uma linha de base superior a zero [53].

Assim, a exatidão do método está em conformidade com a Decisão da Comissão 2002/657/CE [13] com a faixa de recuperação de analitos entre 70 a 110%, obtendo bons resultados em termos de recuperação analítica dos compostos, com recuperações superiores a 90,0% para todos os CCDs pesquisados.

5.1.4. Precisão

5.1.4.1. Repetibilidade

Para o cálculo da repetibilidade, cada analito foi avaliado em três concentrações distintas (0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR), em matriz idêntica de mistura de fígado, com seis réplicas por nível de concentração, repetidas em triplicado e analisadas no mesmo dia. Calculou-se o desvio padrão, σ , e a média, μ . Os valores determinaram-se a partir da curva de calibração. Da média dos σ e μ determinou-se o CV. Este valor não deve ser superior a 2/3 do valor obtido pela equação de Horwitz (equação 6) para cada concentração de LMR.

Os valores obtidos estão apresentados na tabela 24.

Para a narasina os valores obtidos a partir dos resultados da tabela 20 estão descritos na tabela 23.

Tabela 23 - Coeficiente de variação e coeficiente de variação de Horwitz obtido para o composto NRS

Nível fortificação ($\mu\text{g/Kg}$)	σ ($\mu\text{g/Kg}$)	C.V.(%)	C.V. Horwitz (%)	C.V. do método(%)	
25,00	1,68	7,41	27,88	10,55	
50,00	5,48	10,27	25,12	C.V. Horwitz (%)	2/3 C.V. Horwitz (%)
75,00	10,02	13,98	23,63	25,54	17,03

Tabela 24 - Resultados de repetibilidade do método e critério máximo aplicado para os compostos DCZ, RBD, HFG, LSD, MDM ,MSN, NRS, DNC e SLM

Compostos	Repetibilidade	
	CV (%)	$2/3 \text{ CV} = 2^{(1-0.5\log C)}$ (%)
DCZ	15,96	17,31
RBD	13,87	16,74
HFG	15,01	18,08
LSD	13,1	16,74
MDM	15,09	27,18
MSN	16,04	22,06
NRS	10,55	17,03
DNC	13,1	15,08
SLM	14,91	23,68

Na análise dos resultados apresentados para cada CCD pode-se afirmar que os valores obtidos são inferiores $2/3$ do valor obtido pela equação de Horwitz pelo que existe repetibilidade no método para todos os CCDs em estudo.

O composto cuja repetibilidade é superior é a NRS, pois tem um CV inferior aos restantes compostos, 10,55. O composto com repetibilidade inferior é a MSN, cujo CV é superior ao dos restantes compostos, 16,04.

5.1.4.2.Reprodutibilidade

Para o cálculo da reprodutibilidade, tal como para a recuperação e repetibilidade, cada analito foi avaliado em três concentrações distintas (0,5 LMR, 1 LMR e 1,5 LMR), em matriz idêntica de mistura de fígado, com seis réplicas por nível de concentração, repetidas em triplicado e em três dias distintos.

Na tabela 25 apresentam-se a título de exemplo, os valores obtidos para a NRS nas concentrações de 25,00, 50,00 e 75,00 µg/Kg.

Tabela 25- CV do método e CV de Horwitz obtidos para o composto NRS para concentrações de 25,00, 50,00 e 75,00 µg/Kg

Nível fortificação (µg/Kg)	σ (µg/Kg)	C.V.	C.V. do método	C.V. Horwitz (%)
25,00	4,17	18,37	14,41	25,54
50,00	5,44	10,20		
75,00	10,51	14,66		

Na tabela 26 estão apresentados os resultados obtidos para todos os CCDs em estudo.

Tabela 26 - Resultados obtidos para a reprodutibilidade do método e critério máximo aplicado para os compostos DCZ, RBD,HFG, LSD, MDM, MSN, NRS, DNC e SLM.

Compostos	Reprodutibilidade	
	CV (%)	Critério máximo $CV = 2^{(1-0.5\log C)}$ (%)
DCZ	17,06	25,97
RBD	17,72	25,11
HFG	21,83	27,12
LSD	15,22	25,11
MDM	20,03	40,77
MSN	17,33	33,09
NRS	14,41	25,54
DNC	13,48	22,63
SLM	16,05	35,51

Na análise dos resultados apresentados para cada CCD pode-se afirmar que os valores obtidos são inferiores ao valor obtido pela equação de Horwitz (critério máximo) podendo-se afirmar que o método é reprodutível para todos os CCDs em estudo. De facto, o coeficiente de variação, CV, dos resultados não deve nunca ser superior aos valores obtidos pela equação de Horwitz, que é o critério máximo (equação 6), para cada LMR.

O composto para o qual o método é mais reprodutível é a DNC pois apresenta um menor CV, 13,48. Por outro lado o composto para o qual o método é menos reprodutível é a HFG cujo CV é superior ao dos restantes compostos, 21,83. Assim, a precisão do método desenvolvido foi adequada para a validação analítica em conformidade com a Decisão da Comissão 2002/657/CE [13].

5.1.5. Limite de Decisão e Capacidade de Detecção

Os limites de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) foram determinados a partir de amostras da matriz fígado fortificadas na concentração ao nível do LMR de cada CCD. Os resultados analisados foram os da transição iónica menos intensa pois esta corresponde à situação mais crítica do método. A recta de calibração que utilizada para a obtenção dos valores da concentração também correspondeu à área do fragmento menos intenso sobre a área do PI.

De acordo com o regulamento europeu os parâmetros $CC\alpha$ e $CC\beta$ do método desenvolvido compreendem as concentrações acima das quais, o método é capaz de distinguir e quantificar de forma confiável os compostos analisados. Para os CCDs em estudo, o limite de decisão ($\alpha = 5\%$) deve ser igual à concentração do valor do LMR mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão e a capacidade de detecção ($\beta = 5\%$) igual ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão.

No exemplo do composto narasina, fortificaram-se 20 amostras na concentração de 50 $\mu\text{g/Kg}$ determinando-se a concentração na recta de calibração (tabela 19).

Os resultados obtidos para a NRS para a concentração ao nível do LMR estão apresentados na tabela 27.

Tabela 27-Resultados obtidos para a concentração de 50 $\mu\text{g/Kg}$ de NRS

Amostras de fígado fortificadas	Concentração de LMR ($\mu\text{g/kg}$)
1	48,4559
2	41,5547
3	43,6216
4	47,2626
5	52,8300
6	46,4623
7	42,5524
8	54,5246
9	46,0786
10	57,9583
11	50,1794

12	56,7039	
13	55,4368	
14	46,4963	
15	48,1944	
16	49,2806	
17	40,8008	
18	52,3811	
19	47,5165	
20	49,6451	
	48,8968	MÉDIA
	4,919862914	desvio padrão

Os valores obtidos para os CCDs em estudo estão apresentados na tabela 28.

Tabela 28- Resultados obtidos dos parâmetros CC α e CC β para os compostos DCZ, RBD,HFG, LSD, MDM ,MSN, NRS, DNC e SLM.

Compostos	CCα	CCβ
	[μ g/kg]	
Diclazuril	48,0	69,0
Robenidina	56,0	70,0
Halofuginona	35,0	53,0
Lasalocida	73,0	84,0
Maduramicina	2,5	4,5
Monensina	13,0	15,0
Narasina	66,0	79,0
Nicarbazina (dinitrocarbanilina)	108,0	144,0
Salinomicina	6,5	8,0

O $CC\alpha$ é indicativo da qualificação da amostra (detecção ou não detecção) a partir do LMR do CCD pesquisado, ao passo que o $CC\beta$ compreende a característica do método em identificar, com um determinado erro e com uma certeza estatística de $1-\beta$ uma concentração superior ao LMR de um determinado composto. Assim, a partir do $CC\beta$ pode-se dizer, verdadeiramente, que um composto está acima do LMR, mesmo que uma não detecção seja verificada. Por exemplo, no caso da narasina apesar da detecção (com erro α) em concentrações superiores a 66,0 $\mu\text{g/kg}$ o método somente detecta, identifica e quantifica estes compostos verdadeiramente (com certeza estatística $1-\beta$) em concentrações iguais ou superiores a 79,0 $\mu\text{g/kg}$.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo os limites de decisão, $CC\alpha$, para cada CCD são: 48,0 $\mu\text{g/Kg}$ DCZ, 56,0 $\mu\text{g/Kg}$ RBD, 35,0 $\mu\text{g/Kg}$ HFG, 73,0 $\mu\text{g/Kg}$ LSD, 2,5 $\mu\text{g/Kg}$ MDM, 13,0 $\mu\text{g/Kg}$ MSN, 66,0 $\mu\text{g/Kg}$ NRS, 108,0 $\mu\text{g/Kg}$ DNC e 6,5 $\mu\text{g/Kg}$ SLM.

A conformidade da amostra com 95% de certeza confirma-se a partir dos valores de capacidade de detecção $CC\beta$ obtidos para cada CCD: 69,0 $\mu\text{g/kg}$ DCZ, 70,0 $\mu\text{g/kg}$ RBD, 53,0 $\mu\text{g/kg}$ HFG, 8,0 $\mu\text{g/kg}$ LSD, 4,5 $\mu\text{g/kg}$ MDM, 15,0 $\mu\text{g/Kg}$ MSN, 79,0 $\mu\text{g/kg}$ NRS, 144,0 $\mu\text{g/kg}$ DNC e 8,0 $\mu\text{g/kg}$ de SLM.

6. Conclusões e perspectivas futuras

O método desenvolvido neste trabalho demonstrou resultados adequados nos critérios de desempenho, como linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de decisão ($CC\alpha$), capacidade de detecção ($CC\beta$) e robustez, atendendo às exigências estabelecidas pela

Decisão da Comissão 2002/657/CE, com relação à análise de resíduos de CCDs em amostras de fígado de aves, bovinos e suínos.

A recuperação foi um dos parâmetros analisados pois não estavam disponíveis MRC para determinar a veracidade. Para todos os compostos estudados os valores de recuperação foram superiores a 90% e inferiores a 102%. O composto maduramicina apresentou recuperação inferior aos restantes compostos, 90.73%. Este resultado pode ser explicado devido às fortificações da matriz terem sido realizadas com concentrações mais baixas do que para os restantes CCDs, pois tem um LMR inferior. Em relação ao composto que tem um LMR superior, diclaruzil, 1500 $\mu\text{g/Kg}$, a recuperação não apresentou valor superior ao dos restantes compostos. O composto lasolacida apresentou a percentagem de recuperação superior, 101,93%.

Na análise de precisão, os valores de repetibilidade foram inferiores a 2/3 do valor obtido pela equação de Horwitz para cada concentração de LMR. No estudo de reprodutibilidade todos os resultados obtidos foram inferiores aos valores resultantes da equação de Horwitz para cada LMR.

O composto DNC apresentou um menor coeficiente de variação no estudo de reprodutibilidade, sendo portanto o que tem resultados mais reprodutíveis. De referir, tal como descrito anteriormente que as matrizes foram fortificadas com concentrações superiores deste composto.

A robustez do método foi demonstrada pela semelhança do coeficiente de determinação e declive obtidos em 3 rectas de calibração para cada CCD, em três dias diferentes e mudando o operador, demonstrando não haver influência do operador que executa a análise.

De acordo com os resultados de validação para a metodologia desenvolvida conclui-se que este procedimento permite o controle analítico de fígado nas concentrações legisladas para o limite máximo de resíduos dos diversos CCDs.

Em relação à validação do método o estudo de estabilidade deverá ser efectuado para cada CCD. Este estudo poderá ser realizado variando o pH e/ou a temperatura num determinado intervalo de tempo.

Um aspecto importante a ter em conta é o facto dos tecidos edíveis serem sujeitos a manipulação culinária para poderem ser consumidos. Seria importante analisar se ocorre decréscimo dos compostos estudados, e no caso de degradação destes, estudar a toxicidade e concentração dos compostos formados.

7. Referências Bibliográficas

- [1]- S.A. McEwan,, P. Fedorka-Cray, Antimicrobial Use and Resistance in Animals. Clinical Infectious Diseases; 34: S93-106, 2002.
- [2]- C. K. Bower, M. A. Daeschel.. Resistance responses of microorganisms in food environments. International Journal of Food Microbiology; 50: 33 – 44,1999.
- [3]- M. J. Costa. Caracterização dos genes de resistência aos macrólidos e estreptograminas em *Enterococcus* sp. isolados de frangos para consumo humano. Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Controlo da Qualidade apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto 2004.
- [4]- Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho, 8 de Abril de 2006. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990R2377:pt:HTML>. Acedido em 4 de Agosto de 2012.
- [5]- Relatório da Comissão ao conselho e parlamento europeu sobre a utilização de coccidiostáticos como aditivos destinados à alimentação animal. Apresentado ao abrigo do artigo 11.º do Regulamento (CE) n.º 1831/2003 de 22 de Setembro de 2003. COM (2008) 233 final. Bruxelas, 5.5. 2008. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Coccs-233-2008-PT.pdf>. Acedido em 3 de Agosto 2012.
- [6]- Directiva 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1996L0023:20090807:PT:PD> F. Acedido em 4 de Agosto de 2012.
- [7]- Regulamento (CE) nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:PT:PD> F. Acedido em 4 de Agosto de 2012.
- [8]- Directiva 96/22/CE do Conselho, 29 de Abril de 1006, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1996L0022:20081218:PT:PDF>. Acedido em 4 de Agosto de 2012.

- [9]- A.C. Huet *et al.* Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle: development of an ELISA. *Food Additives and Contaminants*; 22(2): 128–134, 2005
- [10]- Directiva 70/524/CEE do Conselho, de 23 de Novembro de 1970, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/council_directive_96_23ec.pdf. Acedido em 4 de Agosto de 2012.
- [11]- Regulamento (CE) nº 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2003, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:pt:PDF>. Acedido em 3 de Agosto 2012.
- [12]- E. Dubreil-Chéneau, M. Bessiral, B. Roudaut, E. Verdon, P. Sanders. Validation of a multi-residue liquid chromatography–tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*; 1216: 8149–8157, 2009.
- [13]- Decisão da Comissão 2002/657/CE, de 17 de Agosto de 2002. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:006:0038:0039:PT:PDF>. Acedido em 3 de Agosto de 2012.
- [14]- Regulamento (UE) nº 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_pt.pdf. Acedido em 10 de Setembro de 2012.
- [15]- Regulamento (CE) n.º 124/2009 da Comissão de 10 de Fevereiro de 2009, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:040:0007:0011:PT:PDF>. Acedido em 10 de Setembro de 2012.
- [16]- Regulamento (UE) n.º 610/2012 da Comissão de 9 de julho de 2012, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:178:0001:0003:PT:PDF>. Acedido em 10 de Setembro de 2012.
- [17]- Regulamento (UE) n.º 885/2010 da Comissão de 7 de Outubro de 2010, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:265:0005:0008:PT:PDF>. Acedido em 10 de Setembro de 2012.

- [18]- Regulamento (CE) n.º 1096/2008 da Comissão de 6 de Novembro de 2008, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:298:0005:0006:PT:PDF>. Acedido em 10 de Setembro de 2012.
- [19]- Regulamento (CE) n.º 496/2007 da Comissão de 4 de Maio de 2007, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:117:0009:0010:PT:PDF>. Acedido em 10 de Setembro de 2012.
- [20]- Regulamento de Execução (UE) n.º 388/2011 da Comissão de 19 de Abril de 2011, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:104:0003:0006:PT:PDF> Acedido em 15 de Setembro de 2012.
- [21]- Regulamento de Execução(UE) n.º 532/2011 da Comissão de 31 de Maio de 2011, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:146:0007:0010:PT:PDF>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.
- [22]- Regulamento (UE) n.º 875/2010 da Comissão de 5 de Outubro de 2010, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:263:0004:0006:PT:PDF>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.
- [23]- Regulamento (CE) n.º 971/2008 da Comissão de 3 de Outubro de 2008, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:265:0003:0005:PT:PDF>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.
- [24]- Regulamento (CE) n.º 976/2008 da Comissão de 6 de Outubro de 2008, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:266:0003:0007:PT:PDF>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.
- [25]- Regulamento de Execução(UE) n.º 59/2013 da Comissão de 23 de Janeiro de 2013, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:021:0021:0022:PT:PDF>. Acedido em 20 de Abril de 2013.
- [26]- Regulamento de Execução (UE) n.º 115/2013 da Comissão de 8 de Fevereiro de 2013, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:011:0001:0001:PT:PDF>.

lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:038:0011:0013:PT:PDF. Acedido em 20 de Abril de 2013.

[27]- Regulamento (CE) n.º 183/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Janeiro de 2005, Jornal Oficial das Comunidades Europeias. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2005/l_035/l_03520050208pt00010022.pdf. Acedido em 15 de Setembro de 2012.

[28]- Guidance for the preparation of dossiers for coccidiostats and histomonostats. EFSA Journal, 9(5):2174, 2011. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2174.pdf>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.

[29]- Scientific report of EFSA to the European Commission to assess the draft Codex MRLs for narasin in cattle and pig tissues. EFSA Journal, 10(1): 2547, 2012. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2547.pdf>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.

[30]- Cross-contamination of non-target feedingstuffs by lasalocid authorised for use as a feed additive. The EFSA Journal, 553: 1-46, 2007. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/553.pdf>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.

[31]- Cross-contamination of non-target feedingstuffs by monensin authorised for use as a feed additive. EFSA Journal, 592: 1-40, 2008. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/592.pdf>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.

[32]- A. Cannavan, G. Ball, D. G. Kennedy. Nicarbazin contamination in feeds as a cause of residues in eggs. Food Additives and Contaminants; (17), 10: 829- 836, 2000.

[33]- Leen Mortier *et al.* Deposition and Depletion of Five Anticoccidials in Eggs J. Agric. Food Chem.; 53: 7142-7149, 2005.

[34]- L. Mortier, E. Daeseleire, C. Van Peteghem. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom; 19: 533–539, 2005.

[35]- L. Mortier, E. Daeseleir, C. Van Peteghem. Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. Journal of Chromatography B; 820: 261–270, 2005

[36]- Directiva 2009/8/CE da Comissão de 10 de Fevereiro de 2009, Jornal Oficial da União Europeia. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:040:0019:0025:PT:PDF>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.

- [37]- A. A. M. Stolker, U.A.Th. Brinkman. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review J. Chromatogr. A; 1067: 15–53, 2005.
- [38]- A. C. Huet *et al.* Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle: development of an ELISA. Food Additives and Contaminants; 22(2): 128–134, February 2005.
- [39]- M. Moloney *et al.* Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A; 1253: 94– 104, 2012.
- [40]- E. Daeselier, P. Delahaut. Integrated Approach for the Control on Residues of Coccidiostats in Eggs. Scientific Support Plan for A Sustainable Development Policy. May 2005.
- [41]- E. Capurro *et al.* Efficient HPLC method for the determination of nicarbazin, as dinitrocarbanilide in broiler liver. Journal of Chromatography B; 822 154–159, 2005.
- [42]- B. Le Bizec, G. Pinel, J. P. Antignac. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. J. Chromatogr. A; 1216 (46):8016-8034; 2009.
- [43]- A. Martínez-Villalba, E. Moyano, M. T. Galceran. Fast liquid chromatography/multiple-stage mass. spectrometry of coccidiostats. Rapid Communication in Mass; 23: 1255–1263, 2009.
- [44]- O. D Prestes, *et al.* O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. Quím. Nova; 36 (5): 697-710, 2013.
- [45]- S. Croubels, M. Cherlet, P. De Backer. Quantitative analysis of diclazuril in animal plasma by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom; 16(15):1463-9, 2002.
- [46]- A. A. Stolker, T. Zuidema, M.W.F. Nielen. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. Trends in Analytical Chemistry; 26 (10) 2007.
- [47]- V. Hagre. Food Safety Testing: Rapid Molecular Methods for Chemical and Biological Hazards. Turun Yliopiston Julkaisuja Annales Universitatis Turkuensis. University of Turku, Finland, 2009.
- [48]- M. Cronly *et al.* Determination of eleven coccidiostats in animal feed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry at cross contamination levels. Analytica Chimica Acta; 700 26– 33, 2011.
- [49]- M. Olejnik, T. Szprengier-Juszkiewicz, P. Jedziniak. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A; 1216: 8141–8148, 2009.

- [50]- Validation of analytical methods: definitions and terminology. London: ICH, 1995. 5 p. (ICH Harmonised Tripartite Guideline). (CPMP/ICH/381/95).
- [51]- Manual de procedimentos técnicos PO-013-HP/BR. Validação de métodos de confirmação por cromatografia líquida ou gasosa com detecção de sinal ou técnicas hifenadas. LNIV 2012.
- [52]- A. G. González, M. Á. Herrador. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles Trends in Analytical Chemistry; 26 (3): 227-238, 2007.
- [53]- D. Ortelli, E. Cognard, P. Jan, P. Edder. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. Journal of Chromatography B; 877: 2363–2374, 2009.
- [54]- A. R. Freitas. Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a detecção e quantificação da Amoxicilina em músculo, por LC-MS/MS. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Química. Instituto Superior Técnico. Outubro de 2008.
- [55]- Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry). EFSA Journal; 10(6):2741, 2012.
- [56]- S. Yakkundi, A. Cannavan, C.T. Elliott, T. Lövgren, D.G. Kennedy, Development and validation of a method for the confirmation of halofuginone in chicken liver and eggs using electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B; 788: 29–36, 2003.
- [57]- L. Mortier, E. Daeseleire, C. Van Peteghem. Determination of the coccidiostat diclazuril in poultry feed and meat by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta; 529: 229–234, 2005.
- [58]- M. Rokka, K. Peltonen. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method. Food Additives and Contaminants; 23(5): 470–478, May, 2006.
- [59]- Cross-contamination of non-target feedingstuffs by narasin authorised for use as a feed additive. The EFSA Journal; 552: 1-35, 2007. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/552.pdf>. Acedido em 15 de Setembro de 2012.
- [60]- R. A. Parise *et al.* Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric assay suitable for quantitation of halofuginone in plasma Journal of Chromatography B; 810: 35–40, 2004.
- [61]- S. Nász, L. Debreczeni, T. Rikker, Z. Eke. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk. Food Chemistry; 133: 536–543, 2012.

[62]- Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the European Commission on the evaluation of the coccidiostat COXIDIN® (Monensin Sodium). The EFSA Journal; 283: 1-53, 2005.

[63]- U.Vincent, Z. Ezerskis, M.Chedin, C. von Holst. Determination of ionophore coccidiostats in feeding stuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Part II. Application to cross-contamination levels and non-targeted feed. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 54: 526–534, 2011.

[64]-T.M Wassenaar. Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine and implications for Human Health; Critical Reviews in Microbiology; 31: 155-169, 2005.

[60]- M.Reig, , F. Toldrá,. Liquid chromatography for the rapid screening of growth promoters residues in meat; Food Anal. Methods;1: 2-9, 2008.

Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica; McGraw-Hill, 2003, Rio de Janeiro.

[65]- Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products. EMEA 1999. EMEA/CVMP/342/99-corr-Final.

[66]- A.L Rodrigues, B. São Braz, S., Abreu B Carrapiço., A. Moreira, A.J Silva. Extraction methodology for antibiotics detection in milk. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics; 1: 149-150, 2006.